

**Zum Problem einer 2-Stufen
Prothrombinbestimmung
unter Zugabe von Acceleratoren**

Hans Robert Forster



Digitized by the Internet Archive
in 2026

**Zum Problem einer 2-Stufen
Prothrombinbestimmung
unter Zugabe von Acceleratoren**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Hans Robert Forster
aus Hilpoltstein/Mfr.

München

1959



5349/60

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Priv. Doz. Dr. med. habil. R. MARX
Dekan: Professor Dr. H. SCHWIEGK

Tag der mündlichen Prüfung: 1.12.59

Durch die erweiterten Kenntnisse der Gerinnungs - Physiologie wurden die Möglichkeiten einer therapeutischen Beeinflussung von Blutgerinnungsstörungen in den letzten Jahren erheblich grösser. Zahlreiche Autoren strebten die Erfassung thrombo - embolischer Erkrankungen durch Gerinnungsteste an. Experimentelle Arbeiten stützten die Annahme, dass die Thrombose-Entstehung auf einer Korrelationsstörung zwischen Thrombin und Antithrombin beruht. Die wesentlichsten Studien über die Physiologie und Pathophysiologie der Blutgerinnung, auf denen die heutigen Erkenntnisse aufbauen, datieren bis ins 19. Jahrhundert. 1872 wurde von A. Schmidt (192-199) im Thrombin (Fibrinferment) jene Substanz entdeckt, die direkt die Blutgerinnung herbeiführt. Er begründete die klassisch gewordene Gerinnungslehre, die Hammarsten (76-79), Morawitz (151), Wöhlisch (237), Howell und Bordet (21, 81) ausbauten.

Nach ihr überführt eine Thrombokinase das im Plasma präformiert vorhandene Prothrombin in Gegenwart von Calciumionen in Thrombin. Dieses Thrombin bedingt die Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin. Erst durch spätere Arbeiten, vorwiegend der letzten 2 Jahrzehnte, erfuhr diese Fermenttheorie ihren heutigen Ausbau. Bis dahin waren folgende Gerinnungsfaktoren bekannt:

1. Das Fibrinogen, von Joh. Müller, 1832 nachgewiesen, erhielt von v. Virchow den heutigen Namen. Hammarsten wies die lösliche Zwischenstufe von Fibrinogen und Fibrin nach. Derselbe Stoff wurde von Apitz 1937 als Profibrin bezeichnet.
2. Das Prothrombin, die unwirksame Vorstufe des Thrombins im Plasma. Synonyma für Prothrombin Proserocyme (22), Prothrombin B (176), Thrombogen (152), Thrombocym (159), Plasmacym.
3. Der Thrombocytenfaktor, der an der Umwandlung des Prothrombin zu Thrombin beteiligt ist und in der deutschen Literatur den Namen Thrombokinase erhielt. Diese wurde erstmals von A. Schmidt als cymoplastische Substanz der Zellen und von seinem Schüler Rautenbach Protocym genannt. Von Dale und Walpole wurde bereits 1916 die inaktive Vorstufe der Thrombokinase im Blutplasma, eine Prothrombokinase, angenommen (238).
4. Calciumionen. Nach Hammarsten sind sie nur für die Entstehung von Thrombin notwendig, nicht aber für dessen Einwirken auf Fibrinogen. Die Thrombokinase entfaltet durch die Calciumionen eine spezifische Wirkung (238).

I. DER HEUTIGE STAND DER GERINNUNGSLEHRE.

Die Forschung differenzierte in den letzten 20 Jahren weitere Faktoren, die die klassische Gerinnungstheorie nicht widerlegten, sondern erheblich erweiterten. Die grosse Zahl der neu entdeckten Faktoren ist besonders dadurch verwirrend, dass die Untersuchungen häufig gleichzeitig oder mit verschiedener Methodik durchgeführt wurden und die Vergleiche der Ergebnisse durch die eigene Nomenklatur eines jeden Untersuchers erschwert wurden. An der Aktivierung der Thrombokinase sind mindestens 3 Faktoren im Plasma, Serum, Thrombocytenfaktor und ionisiertes Calcium beteiligt. Eine aktive Thrombokinase ist im strömenden Blute nicht enthalten. In den Thrombocyten sind mehrere Substanzen enthalten, die an verschiedenen Stellen des Gerinnungssystems eingreifen. Gemäss den Untersuchungen von v. Creveld (38) und Jürgens (104) enthalten die Thrombocyten 3 gerinnungsaktive Substanzen und eine Substanz mit Antiheparinwirkung.

Gefässaktive Substanzen sind das Agglutinin oder clottable factor, das Retractocym oder Thromboglutin, das Serotonin und ein Gefässdilator.

Gerinnungsaktive Substanzen:

- a) Der Thrombocytenfaktor 1, der identisch ist mit dem Plättchenacceleratoreoglobulin und wahrscheinlich identisch ist mit dem Citin von Marx.
- b) Der Thrombocytenfaktor 2, der auch Thrombinaccelerator genannt wird. Er verstärkt die Thrombinwirkung.
- c) Der Thrombocytenfaktor 3, der identisch ist mit dem Plättchenfaktor der Thrombokinase von Jürgens, mit dem Thrombocytenfaktor 4 von Baserga, mit der Thromboplastinoginase und mit dem Thromboplastik cell component von Shinovara (42). Er stellt einen thrombokinasebildenden Faktor dar, der mit Faktor VIII, IX, X reagiert. Die Reaktion zwischen dem Thrombocytenfaktor und Plasmafaktor der Thrombokinase wurde verschiedentlich untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass weder der Plasmafaktor IX, noch der Zellfaktor alleine im Stande seien, gereinigtes Prothrombin zu aktivieren.
- d) Der Thrombocytenfaktor 4, der von Jürgens Heparininhibitor genannt wird und eine heparinneutralisierende Wirkung hat.

Das klassische Gerinnungsschema wurde in dem Sinne erweitert, dass den 4 bekannten Gerinnungsfaktoren der Faktor V angefügt wurde. Dieser ist in seiner aktivierten Form, dem Faktor VI, für die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin erforderlich. Auf P.A. Owren (162-164) gehen die ersten Beobachtungen über einen Thrombinaccelerator zurück, der ein Proencym als 5. Gerinnungsfaktor annahm, das zur Thrombinbildung notwendig ist und bei der sogenannten Parahämophilie fehlt. Das Plasmaacceleratorglobulin, wie Seegers (233-235) es bezeichnete, wird aus einer inaktiven Vorstufe durch geringe Mengen Thrombin in das aktive Serum-Acceleratorglobulin umgewandelt und die Thrombinbildung beschleunigt. Es soll in seiner Entstehung von der Anwesenheit des Vitamin K abhängig sein (238). Nach neuerer Auffassung (115) sind mit diesen Faktoren identisch:

Der bereits 1943 von Quick (176, 177) entdeckte "Labile Faktor" (179), das Prothrombin A von Quick (138), das Thrombogen von Nolf (158, 160), das Accelerin und Proaccelerin von Astrup und Owren (9), die Proprothrombokinase von Owren (164), die Proprothrombokinase (164), der Acceleratorfaktor von Fantl und Nance (50), der Cofaktor des Thromboplastin von Honorato (85), der Plasmaprothrombinconversionsfaktor von Stefanini, PPCF (226), Labile Komponente von Stefanini (226), die Prothrombinokinase von Milstone (148).

Mit dem Faktor VI ist identisch: Das Serum Acc. Globulin (5), die Prothrombinase Owren (164), die Prothrombinogenase Owren (164), der Serumaccelerator von Stefanini (226) und das Accelerin von Owren (167).

Koller (115) beschrieb einen wesentlich stabileren Faktor. In Fortsetzung der Nummerierung von Owren bezeichnete er ihn als Faktor VII. Er kommt in einer inaktiven und aktiven Form vor. Er stimmt überein mit dem Serum Prothrombinconversionaccelerator (SPCA) von Alexander u. M. (5, 230), dem Co-Thromboplastin von Mann und Hum (136), dem Prothrombinconversionsfaktor von Owen und Bollmann (161), mit dem Co-Faktor V von Owren (164), dem Prothrombinaccelerator von Mac Millan (134), dem Prothrombinconvertingfaktor von Jacox (91), dem Plasma-Precursor von Alexander, Goldsteine, Landwehr (5), dem Pro-Convertin von Owren (167), dem Prothrombinogen von Quick und Stefanini (181), dem Sérocyme von Bordet (22), dem Stable Factor von Stefanini (227), mit dem im Serum vorkommenden Faktor Convertin von Owren, dem Kappa-Faktor von Sorbye, Kruse und Dam (219, 39), dem Thrombotropin von Kudryashov (119), dem Propriété excitoproductrice de la Thrombine du Serum Bordet (42, 23).

Im Plasma von Normalpersonen konnte durch Govaerts und Gratia (65) eine Eiweissfraktion abgetrennt werden, die im Stande war, die Gerinnungsstörung des Hämophilen Blutes weitgehend aufzuheben. Sie wurde Faktor VIII genannt und ist identisch mit dem antihämophilen Globulin (129), dem Plasmakinin (120), dem Thromboplastinogen (182), dem Thrombocytolysin (26), dem Thrombokatalysin (126), dem Thromboplastikplasmacomponent (TPC) von Shinovara (214), der Plasmaprothrombokinase (55), dem Facteur antihémophilique A (221), dem Plasmathromboplastic factor PTF (184), dem Antihämophilen Globulin A (37), dem Plasma-Thromboplastik Faktor A (184), dem Platelet Cofactor I (95).

Durch eine neue Bestimmungsmethode, mit der man die Aktivierung der Plasma-Prothrombokinase untersuchte, unterschieden Biggs und Mc Farlane (16) zwischen Hämophilie A und B. Sie berichteten 1952 über eine Form der Hämophilie, bei der nicht das antihämophile Globulin-Faktor VIII - sondern der bis dahin unbekannte Faktor IX, der Christmas-Faktor vermindert war (41, 81). Nach Mc Farlane (14) ist dieser Faktor identisch mit dem PTC-Faktor = Plasma Thromboplastik Component B von Aggeler u. M. (3) und dem Plasma-Faktor X von Schulmann und Smith (201).

Weitere Synonyma für Faktor IX sind Facteur antihémophilique B von Soulier und Larrieu (221), das Antihämophilie Globulin B von Cramer (184), der Platelat Cofaktor II von Johnson, Seegers (95).

Koller (113, 114) konnte mit Hilfe des Plasmathrombokinasebildungstestes einen Faktor X nachweisen. Für die Existenz eines weiteren Faktors, des sogenannten Plasmathromboplastin-Antecedent (PTA) sprechen Untersuchungen von Rosenthal u. M. (189). Mit dem PTA-Faktor soll der Plasma-Thromboplastik-Faktor C von Aggeler identisch sein (42). Widersprechende Resultate gestatten noch nicht zu entscheiden, ob der Hagemann-Faktor mit dem PTA-Faktor identisch ist oder nicht (225).

Dagegen wurde von Graham, Hougie, Telfer, Denson und Wright ein neuer Gerinnungsfaktor mit Acceleratorwirkung beschrieben, für den die Namen der ersten Patienten Stuart und Prower, bei denen sich ein Mangel dieses Faktors feststellen liess, vorgeschlagen wurde. Er unterscheidet sich von Faktor VII und ist für die Überführung von Prothrombin in Thrombin in Gegenwart von Gewebsthrombokinase notwendig (66).

In unserem Gerinnungsschema soll auch noch die autokatalytische Entstehung von Thrombin angedeutet werden. Das Thrombin, dessen Quelle das Prothrombin ist, wandelt das Plasma-Accelerator-Globulin in das zehnmal aktivere

Serum Accelerator-Globulin (VI) um, das sich dann wesentlich an der Umwandlung von Prothrombin in Thrombin beteiligt. Accelerin kann aber nur dann wirken, wenn gleichzeitig Convertin vorhanden ist. Erst beide Faktoren zusammen ergeben das für die schnelle Prothrombin-Umwandlung erforderliche Prinzip. Das Thrombin katalysiert also seine eigene Bildung auf dem Umweg über die Entstehung von Serum-Accelerator-Globulin und Convertin. Ausserdem labilisiert das Thrombin die Thrombocyten. Sie zerfallen leichter und setzen damit den Plättchenfaktor der Thrombokinasen frei. Thrombin fördert ferner die Aktivierung des antihämophilen Faktors aus seiner inaktiven Vorstufe.

II. ANTITHROMBINE.

Den bisher genannten gerinnungsfördernden Faktoren, insbesondere II und III, stehen in einem fein ausregulierten Gleichgewicht gerinnungshemmende Substanzen gegenüber, die unter dem Sammelnamen Antithrombine zusammengefasst sind. Nach Jürgens (101) werden als antithrombische Substanzen zwei chemisch und wirkungsmässig völlig verschiedene gegen Thrombin gerichtete Hemmkörper unterschieden.

- a) Ein Holoferment Antithrombin, auch Thrombininhibitor genannt, besteht aus einer prosthetischen Gruppe (Heparin) und einem Co-Ferment, das Howell und Holt (88) Co-Faktor, Chargaff, Ziff und Moore (33), Heparinkomplement, Astrup und Darling (8), Thrombin-Co-Inhibitor nannten.
- b) Ein Serum-Antithrombin oder progressives Antithrombin SAT (64, 239, 70) das eine lipoidartige Substanz als Wirkgruppe hat, und wie der Thrombininhibitor ein Albumin als Apo-Ferment benötigt. Es inaktiviert überschüssiges Thrombin unter Bildung von inaktivem Metathrombin (124, 125, 208).

Copley und Robb (35) beobachteten im Tierversuch, eine Verminderung der Blutplättchen proportional der Heparinkonzentration, Jensen (94) eine Verhinderung des Freiwerdens von Thrombokinasen aus den Thrombocyten, die sich aus zwei Strukturelementen, dem Granulomer mit gerinnungsfördernder Wirkung und dem Hyalomere als Träger des die Retraktion auslösenden Faktors zusammensetzen (60).

Durch Heparin wird die Gerinnung mehrfach beeinflusst. Über den Mechanismus der Wirkungen besteht noch keine Übereinstimmung. Nach Howell und

Holt (88) aktiviert es ein Pro-Antithrombin zum Antithrombin, nach Mellanby (144) soll es in Gegenwart von Neutralsalzen direkt wirken. Nach Quick (183) soll es die normalerweise geringe Affinität von Thrombin zu dem im Blute vorhandenen Antithrombin steigern und somit indirekt wirken. Snellmann (217) und Lyttleton (133) erscheint es am wahrscheinlichsten, dass sich Thrombin und Heparin miteinander verbinden unter Veränderung der elektro-phoretischen Mobilität des Thrombins und unter Beteiligung eines Eiweiss-körpers als Co-Faktor. Eine Beeinflussung der Reaktion zwischen gereinigtem Thrombin und Fibrinogen dürfte noch in den Bereich der polyvalenten Heparinwirkung fallen (215, 110). Zu dieser Reaktion ist kein Co-Faktor erforderlich. Letztere Autoren sind der Ansicht, dass Heparin die Fähigkeit des Fibrinogens steigern solle, Thrombin zu adsorbieren.

Nach Seegers sind im Plasma 4 Faktoren gegen Thrombin gerichtet (213):

- a) Das Antithrombin I, das identisch ist mit der Wirkung des Fibrin, das Thrombin durch Adsorption inaktiviert.
- b) Das Antithrombin II, das ein plasmatischer Co-Faktor I ist, und identisch mit dem Thrombincoinhibitor ist, der mit Heparin den Thrombininhibitor bildet und offenbar die Reaktion zwischen Thrombin und Fibrinogen beeinflusst, ohne Thrombin zu zerstören (Synonyma: Plasma-Antithrombin, Antithrombine immédiate, Albumin X (griechisch Chi.).
- c) Das Antithrombin III, dessen Wirkung heparinunabhängig ist. Synonyma: Das Serum-Antithrombin SAT, Antithrombine progressive, Metathrombinogen. Die Thrombinaktivierung erfolgt durch Bildung von Metathrombin.
- d) Das Antithrombin IV, auch Anti-Thrombin-Accelerator genannt, soll in die Prothrombinumwandlung eingreifen und während des Ablaufes der ersten Phase im Plasma gebildet werden. Es ist Heparin, das mit einem Co-Faktor durch Inhibitorbildung der Prothrombin-Aktivierung entgegen wirkt (54, 208). Einmal soll es direkt wirken (88), andere Autoren (47, 25) fanden, dass Heparin in einem gereinigtem Gerinnungssystem wirkungslos ist. Es bedarf eines Co-Faktors II, der im normalen Plasma enthalten ist. Seine Existenz wurde von Burstein und Quinant (28) bestätigt.

Anti-Prothrombin soll in myeloischen Zellen enthalten sein und sich von Mastzellen-Heparin deutlich unterscheiden (42). Zahlreiche Beobachtungen sprechen für eine Antithrombokinasewirkung des Heparins, wobei auf verschiedene Faktoren ein verschieden stark hemmender Einfluss ausgeübt wird (121, 168). Ob Heparin dabei alleine oder ebenfalls nur mit einem Co-Faktor

wirkt, konnte noch nicht geklärt werden (57, 58). Die schnelle Inaktivierung von Accelerin im Serum wird auf einen Hemmstoff zurückgeführt, der bei der Isolierung des Accelerins gefunden wurde (128). Kingsley (109) gab ebenfalls die Existenz eines Antiaccelerins an. Es findet sich besonders im thrombocytenreichen Plasma. Jürgens (105) gelang es, einen Hemmstoff des Proconvertins aus Plasma zu isolieren, der nicht identisch ist mit dem Antithrombin und Thrombininhibitor. Emmeneger und Lüscher (48) nahmen an, dass Antihistaminika Faktor VII inaktivieren.

Über den Einfluss des Heparins nach der Gerinnung auf die Fibrinolyse wurden einige Mitteilungen gemacht (69, 74, 86). Es steigert die Fibrinolyse. Ausser den bisher erwähnten Faktoren ist das im Plasma vorkommende Fibrinolytin oder das in einer inaktiven Vorstufe vorkommende Pro-Fibrinolysin direkt oder indirekt mit dem Gerinnungsvorgang in Verbindung gebracht worden (34, 56, 73, 108, 140, 147). Es wird durch eine Antiproteinase (Antifibrinolysin, Antiplasmin) gehemmt (10).

Synonyma für Fibrinolysin: Plasmin, Tryptase, Lysin.

Synonyma für Profibrinolysin: Plasminogen, Tryptogen, Prolysin und Lytic Factor.

Die Aktivierung des Profibrinolysins hat Ähnlichkeit mit der Aktivierung des Prothrombins. Eine Fibrinokinase findet sich in fast allen Körperzellen und im Serum.

Synonyma für den Hemmstoff des Fibrinolysins, das Antifibrinolysin: Antiplasmin, Thromboligin, Fibrinolysininhibitor, Serum Antitryptase, Antiprotease.

Über die Wirksamkeit des Thrombin auf die Fibrinolyse wurden Untersuchungen angestellt. Es wurde beobachtet (169, 174), dass in Citratlösungen isolierte Thrombine eine beachtliche fibrinolytische Aktivität entwickelten. Im Gegensatz zum Plasma-Fibrinolysin wurde das Thrombin durch das im Plasma vorkommende Anti-Fibrinolysin nicht gehemmt.

Die erste Beobachtung, dass eine haemorrhagische Diathese, durch Vitamin-K Mangel hervorgerufen, auf einer starken Verminderung des Prothrombingehaltes des Blutes beruhte, machten Quick und Schönheyder. Die Existenz dieses Koagulationsvitamins haben 1934/35 Dam, Schönheyder und Almquist-Stokstad nachgewiesen (106, 173). Die Art und Weise dieser Beziehung blieb unklar. Von einigen Autoren wurde der direkte Einbau des Vitamin K in den Prothrombinkomplex angenommen. Die heutige Auffassung ist, dass das Vitamin K ein Baustein im Ferment-System zur Prothrombinbildung speziell ist.

Es soll von der Leberzelle als Co-Ferment mit einem spezifischen Apo-Ferment zusammengefügt werden und so katalytisch wirksam sein. Anti-Prothrombine könnten möglicherweise diesen Bildungsmechanismus in der Leberzelle durch Blockierung des Vitamin K oder der Leberzellenfunktion hemmen. Darüber hinaus erstreckt sich die Vitamin-K-Wirkung nach Marx (124) noch auf die Synthese anderer Plasma-Eiweisskörper.

III. GERINNUNGSHemmUNG.

Im Folgenden soll nun eine besondere Form der Gerinnungsstörung und ihre gezielte Therapie besprochen werden, die praktisch erst dadurch möglich wurde, dass neben neuen gerinnungsverzögernden Mitteln auch neue Untersuchungsmethoden entwickelt wurden.

- 1) Die Beeinflussbarkeit der Blutgerinnung im Sinne einer Hemmung oder Verzögerung war bekannt, in Vitro:
Durch Kälteeinwirkung, Paraffinierung der Gefässe, durch Neutralsalze wie MgSO_4 , Na_2SO_4 und NaCl in grossen Konzentrationen, durch Calciumfällende Oxalat-Citrat-Fluoridionen und Seltene Erden (71, 82, 185). Neutralsalze scheinen nach neuen Untersuchungen für die Antithrombinwirkung, zumindest für die Wirkung von Antithrombin III erforderlich zu sein (90). So wirken in derselben Weise Ionenaustauscher. Werden nur Kationen entfernt, so kommt es zu keiner Änderung der Antithrombinaktivität. Wahrscheinlich wird Thrombin direkt beeinflusst.
- 2) Bekannt war, dass bei der Entstehung der Thrombose häufig eine Erhöhung von Faktor II, III und VII eine Rolle spielte. Die frühere Therapie beruhte auf Versuchen, den Antithrombintiter zu erhöhen, um damit die Gerinnung zu verzögern. So durch das Hirudin, dessen gerinnungshemmende Wirkung von Haycraft (80) entdeckt wurde. Um seine Reindarstellung, die 1903 Franz (61) gelang, bemühten sich Krüger (118), Dickinson (43), Schultze (202) und Blobel (19). Wichtiger war, das 1916 von Mc Lean (149), Howell und Holt (88, 89), entdeckte Heparin, das in der Behandlung und Prophylaxe thromboembolischer Erkrankungen heute seinen festen Platz hat. Es gelang die chemische Zusammensetzung des Heparin zu klären, die biologische Bedeutung der Ehrlichschen Mastzellen aufzuklären und deren Beziehung zu diesem physiologischen Antikoagulans festzustellen (7, 96-100). Als erste wandten Murray (154) und Crafoord (36) Heparin therapeutisch an.

Eine weitere Wandlung in der Thrombosenbehandlung trat mit der Einführung der Dicumarole ein (130). Es wurde jetzt nicht mehr versucht den Antithrombintiter zu erhöhen, sondern man verlegte den Angriffspunkt in die Blutgerinnung und zwar direkt in die Prothrombinsynthese. Man beobachtete, dass bei einer bestimmten prozentualen Senkung der Prothrombinwerte eine vivo-Gerinnung unter normalen Bedingungen nicht mehr möglich war. Anschütz (6) und Fresenius (62) synthetisierten 1902 erstmals das Dicumarin, ohne seine Wirkung auf die Blutgerinnung festgestellt zu haben. 1924 wurde es durch die Veterinärmedizin entdeckt. Schoffield (200) fand, dass Rinder, die mit verdorbenem Süßklee gefüttert wurden, schwere hämorrhagische Diathesen bekamen. Roderick (188) und Quick (175) konnten als Ursache dieser Erkrankung (sweet clover disease) eine starke Abnahme des Prothrombin im Blut nachweisen. Die Reindarstellung jenes antikoagulativen Stoffes, auch Antivitamin K genannt, aus Melilotus-Heu gelang Campbell-Robert-Smith-Link (31). Bingham-Meyer-Pohle (17) und Butt-Allen-Bollmann (29) führten erstmals Untersuchungen am Menschen durch.

Der Angriffspunkt des Dicumarol ist die Prothrombinsynthese der Leber. Es scheint dabei, dass es zu einer Blockierung der Vitamin-K-Wirkung kommt. Eine eigentliche Leberschädigung, wie sie von verschiedenen Autoren angegeben wurde, (107, 191) ist nie sicher bewiesen worden. Die Tatsache, dass man mit entsprechenden Mengen Vitamin - K₁ die Dicumarolwirkung je nach den kumulativen Eigenschaften der verschiedenen Präparate schlagartig aufheben, bzw. reversibel machen kann (45, 103, 135, 224) spricht eher dafür, dass diese Vorgänge nach dem Massenwirkungsgesetz ablaufen, das heisst, dass im Blut ein Gleichgewicht zwischen thromboplastischen und antithromboplastischen Kräften besteht. Ein gesunder Organismus kann Störungen dieses Gleichgewichtszustandes durch Gegenregulationen ausgleichen. Ein Versagen der Gegenregulation kann einerseits zu Thrombosen, andererseits zu Blutungen führen. Untersuchungen mit Dicumarol, das mit ^{14}C radioaktiv markiert war (93) sprechen ebenfalls gegen eine direkte Leberschädigung. Nach Vitamin-K Gabe fand man ein beschleunigtes Verschwinden von Dicumarol aus der Leber, in der sonst normal noch über Tage ein gewisser Prozentsatz der injizierten Dicumaroldosis verblieb. Es ist offenbar ein Verdrängungsmechanismus zwischen Dicumarol und Vitamin - K anzunehmen. So wird von einer Affinität des Dicumarol und Vitamin-K zu dem Spezifischen Apo-Ferment gesprochen (63), was durch den Isotopenversuch bestätigt wurde.

Bei der Anwendung der gerinnungshemmenden Substanzen ist der Erfolg nicht an die Normalisierung bestimmter Dysregulationen geknüpft, sondern an die Induzierung eines unphysiologischen Zustandes, nämlich an die Herabsetzung der Gerinnungstendenz (155). Dabei beruht die Wirkung dieser Präparate auf einer isolierten Erniedrigung des Plasmaspiegels folgender Gerinnungsfaktoren: Prothrombin, Faktor VII, und bei sehr hoher Dosierung auch Faktor V/VI (131). Fahey, Olwen, Ware (49) sowie Owen und Bollmann (161) sahen erstmals eine starke Erniedrigung der Acceleratorglobuline, bei Anwendung von Dicumarolderivaten. Dabei sinkt der Faktor VII schneller und tiefer als das Prothrombin ab (111, 112, 116, 117, 153, 157), während der Faktor V keine oder nur geringe Veränderung zeigt.

IV. BISHERIGE UNTERSUCHUNGSMETHODEN.

Aus der aktiven Therapie mit Antikoagulantien ergab sich die Notwendigkeit einer geeigneten Kontrolle, also einer Methodik, die hinsichtlich ihrer Werte Sicherheit bot und auch in einem klinischen Labor durchführbar war. Über die Forderung der Kontrolle sind sich die Autoren einig (13, 15, 44, 46, 51, 83, 155, 222, 228). Über die Art der Überwachung und der Methode selbst sind die Meinungen geteilt (18, 20, 24, 27, 67, 68, 75, 84, 132, 145, 207, 223).

a) Bürker (30) beschrieb 1904 eine Gerinnungsbestimmung des Gesamtblutes. Howell (87) legte 1914 seiner Bestimmung die Ansicht zu Grunde, dass ein Chlor-Calciumüberschuss im Blutplasma die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin unterstütze. Er unternahm den ersten Versuch, auf diesem Wege das Prothrombin quantitativ zu erfassen.

Wöhlisch (237) zeigte, dass bei der Blutgerinnung neben dem Prothrombin die Thrombokinase einen wesentlichen Faktor darstellte. Quick entwickelte eine Einstufenmethode, die bis heute noch die am meisten verbreitete und angewandte Bestimmung darstellt (175). Ihr Prinzip bestand darin, dass zu Natriumoxalatplasma bei konstanter Temperatur (37°C) ein Überschuss von Thrombokinaselösung und Calciumionen gegeben wurden. Diesem Grundprinzip folgten Modifikationen von Shapiro (214), Lehmann (123), Halse (72), Jürgens (102), Marx - Bayerle (141), Fiechter (59), Marbet-Winterstein (137), Soulier (220) u. a. (53, 127, 156, 170, 172, 190, 192).

b) Dem gegenüber entwickelten Warner-Brinkhaus-Smith (231) eine Zweiphasenmethode, die sich nicht von der Quick'schen Einstufenmethode ableitete und auf einem anderen Prinzip aufgebaut ist. Sie beruhte auf einer Serientitration, wobei Fibrinogen durch Thrombinzusatz entfernt wird. Infolge ihrer Umständlichkeit fand sie geringe Verwendung. Rieben (186, 197) schuf eine Zweiphasenmethode, die von Schultze (203) modifiziert wurde. Dabei wurde eine Anzahl weiterer Faktoren im Überschuss hinzugegeben, um die Gerinnungsstörungen gezielter zu erfassen. Thrombokinasen, Calciumionen und Fibrinogen wurden durch Zugabe optimaler Mengen, der Antithrombintiter durch entsprechende Verdünnung, als Unbekannte ausgeschaltet und der Acceleratorenkomplex durch eine geeignete Versuchsanordnung erfasst.

STELLUNGNAHME:

Die sogenannte Einphasenmethode arbeitet mit 6 Unbekannten:

1. dem Prothrombin, 2. dem Faktor V/VI, 3. dem Faktor VII, 4. dem Stuart-Prower-Faktor, 5. dem Antithrombintiter und 6. dem Fibrinogen. Nur Faktor III und IV wurden im Überschuss hinzugegeben. Man erkannte, dass die Gerinnungsbeschleunigung nicht nur von der Prothrombinmenge, sondern auch von den anderen Faktoren abhing. Der Umbau von gereinigtem Prothrombin in Thrombin unter Zugabe von Calciumionen und Thrombokinasen erfolgt nur sehr langsam (4). Eine weitere Fehlerquelle bildeten die Antithrombine und der Acceleratorenkomplex. In der Mehrzahl der Dicumarolbehandlungen genügte praktisch zunächst eine der Einphasenmethoden. Es wurde jedoch immer wieder über Beobachtungen berichtet, bei denen trotz therapeutisch günstig eingestellten Prothrombinindex entweder Blutungen auftraten, oder es sekundär zu einem Weiterwachsen der Thrombose und sogar zu Embolien kam (12, 40, 146, 209, 216, 229).

Bei der Zweiphasenmethode bleibt als Unbekannte das Prothrombin, während für den Acceleratorenkomplex ein Mischwert erhalten wird, der nicht ohne weiteres differenziert werden kann. Bei funktionstüchtiger Leber ist die gleichzeitige Senkung des Acceleratorenkomplexes unter Dicumarol durch eine Verminderung des Faktors VII und Stuart-Prowerfaktor bedingt, während bei einer geschädigten Leber die Verminderung auch durch den Faktor V/VI hervorgerufen wird.

Da die Verminderung des Faktors V auch bei sonst negativer Eiweißstabilitätsreaktion der Leber vorkommt, und diese die zur Zeit feinste Reaktion auf eine Störung der Eiweißsynthese in der Leber darstellt, steckt hierin eine

weitere diagnostische Fehlerquelle, die es zwar ohne weiteres erlaubt, eine exakte Einstellung auf Dicumarol vorzunehmen, jedoch keine sicheren Schlüsse auf die wirkliche Senkung des Acceleratorpotentials zulässt.

Es wurden isolierte Bestimmungen der Blutgerinnungsfaktoren ausgearbeitet, die es erlauben, die bisher unbekannten Faktoren einzeln und exakt zu erfassen (204, 205).

Im Zusammenhang mit der Dicumarolbehandlung der Thrombose interessiert hierbei besonders die Ein- und Zweiphasenmethode nach Schultze. Bei dieser Modifikation der Einphasenmethode wird durch Verdünnung des Plasmas der Antithrombintiter, Fibrinogen und standardisierte, isolierte Faktoren V und VII hinzugegeben. Bei der Zweiphasenmethode wird dem Acceleratorenkomplex durch getrennte Zugabe der Faktoren Rechnung getragen.

V. EIGENE VERSUCHE.

Unabhängig von Schultze arbeiteten wir an demselben Problem, indem wir den Versuch unternahmen, durch Zugabe eines Acceleratoren gemisches (AC 76) auf eine quantitative Prothrombinbestimmung zu kommen. Es wurde dabei von folgender Überlegung ausgegangen:

Wenn man die unbekannten Faktoren durch Zugabe der einzelnen Substanzen in bestimmter Konzentration und den Antithrombintiter durch Verdünnung ausschaltet, dann müsste die Gerinnungszeit auf den einzigen restlichen Faktor, das Prothrombin, zurückzuführen sein. Dabei wurde ein Intaktsein der Plasmaprothrombokinase vorausgesetzt und als Versuchssubstrat nur dementsprechende Seren verwendet. Die Kenntnis des Prothrombingehaltes ist zur exakten Indikationsstellung der Vitamin-K-Therapie klinisch wichtig, da das antihämorrhagische Vitamin K im Falle intakter Leberfunktion einen eventuellen Prothrombinmangel prompt zu normalisieren vermag.

VERWENDETE APPARATUREN:

1. Ein Thermostat (37°C) mit Drehvorrichtung für Gläser mit gleichem Durchmesser,
2. Reagenzgläser,
3. graduierte Pipetten (5 ccm, 1 ccm, 0,25 ccm),
4. Stoppuhr mit Schleppzeiger, die ein genaues Ablesen von Minuten und Sekunden gestattet,
5. Glasperlen,

6. ein zweiter Thermostat mit Wassergefäß zum Konstanthalten der Temperatur (Inaktivierung der Thrombokinese),
7. Zentrifuge,
8. Spritze zur Blutentnahme.

REAGENZIEN:

1. Fibrinogenlösung.

Zubereitung: Der Inhalt eines Originalröhrchens Fibrinogen-Behringwerke von 60 mg wird mit einem Glasstab leicht zusammengedrückt und 5 ccm steriler physiologischer Kochsalzlösung dazugegeben. Der Lösungsansatz wird für 10 Minuten in einen Thermostaten von 37°C gestellt, bis zur Quellung und Auflösung des Fibrinogens. Ungelöste Anteile werden mit dem Glasstab verrührt, jedoch erst, nachdem die Spontanquellung erfolgte. Nach Zugabe von weiteren 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung ist die Fibrinogenlösung (0,6%) gebrauchsfertig.

2. a) Calcium-Chorid: für Zweiphasenmethode.

2 g CaCl_2 kristall. ($6 \text{ H}_2\text{O}$) und 8,5 g reines NaCl in 1000 ccm destill. Wasser = 0,2 % $\text{CaCl}_2 - 6 \text{ H}_2\text{O}$ enthaltende physiologische Kochsalzlösung.

b) für Einphasenmethode:

4 g $\text{CaCl}_2 - 6 \text{ H}_2\text{O}$ und 8,5 g reines NaCl in 1000 ccm destill. Wasser gelöst = 0,4 % $\text{CaCl}_2 - 6 \text{ H}_2\text{O}$ enthaltende physiologische Kochsalzlösung.

3. a) Thrombokinese:

1 Aus getrocknetem Kaninchenhirn - Behringwerke.

Herstellung einer Thrombokinese für die Zweiphasenmethode. Für die Versuche wurden 2 Lösungen mit verschiedenen Calciumkonzentrationen verwendet.

Zubereitung: Der Ampulleninhalt (80 mg) wird mit 2 ccm physiologischer Kochsalzlösung versetzt. Der Inhalt wird ein paar Minuten geschüttelt und hierauf mit 6 ccm physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Die Hirnaufschwemmung wird für 30 Minuten in ein Wasserbad von 56°C gestellt. Nach Abkühlung auf Zimmertemperatur fügt man 8 ccm CaCl_2 -Lösung (2a) hinzu und schüttelt das Gemisch gut durch. Anschliessend wird das Gemisch 5 Minuten bei 3000 Umdrehungen zentrifugiert und abfiltriert.

a₂) Thrombokinas Zubereitung wie vorgehend geschildert.

Die Aufschwemmung wurde nach Abkühlung mit 8 ccm 0,4 % $\text{CaCl}_2 - 6 \text{H}_2\text{O}$ enthaltender physiologischer Kochsalzlösung versetzt (2b).

b) Herstellung einer Thrombokinaselösung für das Einphasenverfahren: Der Ampulleninhalt (80 mg) wird in ein Reagenzglas überführt, mit 2 ccm physiologischer Kochsalzlösung versetzt, einige Minuten geschüttelt und weitere 2 ccm physiologischer Kochsalzlösung hinzugegeben. Nach 5 Minuten langem Stehen werden 4 ccm einer 0,4 % $\text{CaCl}_2 - 6 \text{H}_2\text{O}$ - Lösung dazugegeben und gut durchmischt. Das Extraktionsgemisch bleibt 5 Minuten lang stehen und wird anschliessend 5 Minuten bei 3000 Umdrehungen zentrifugiert. Der Abguss wird durch Papier filtriert.

4. Veronalpufferlösung:

a) P_H 7,6 : 1,471 g Veronalnatrium, 0,971 g Natriumacetat (3 H_2O) in 50 ccm destill. Wasser gelöst und 48 ccm n/10 HCL auf 250 ccm mit destill. Wasser aufgefüllt. Originalampullen Behringwerke mit 20 ccm Inhalt.

b) P_H 6,7 : 1,417 g Veronalnatrium, 0,971 g Natriumacetat (3 H_2O) in 50 ccm destill. Wasser gelöst und 65 ccm n/10 HCL, auf 250 ccm mit destill. Wasser aufgefüllt. Originalampullen Behringwerke mit 20 ccm Inhalt.

5. ACC 76 - Behringwerke (vorläufige Bezeichnung):

Accelerin und Convertingemisch aus menschlichem Plasma. Packung mit Fläschchen zu 100 mg ACC-76 und einer Ampulle physiologischer Kochsalzlösung zu 10 ccm, pyrogenfrei. Es wurde in verschiedener Verdünnung angewandt.

6. Venenblut: Zu 0,2 ccm einer 3,8 % Citratlösung wird mit einer sterilen Spritze 1,8 ccm Venenblut entnommen (1:9). Durchmischen des Blutes durch Kippen der Spritze. Zur Trennung der Blutkörperchen vom Plasma wird die Blutmenge 15 Minuten bei 3000 Umdrehungen zentrifugiert.

ÜBERLEGUNGEN:

Bei Versuchsbeginn war das ACC-76 das einzige Präparat, das die Faktoren V, VI, VII, IX, X und XI enthielt. ACC-76 ist ein aus menschlichem Serum

gewonnenes Gemisch von Convertin (Faktor VII) den Faktoren IX, X, XI und einem geringeren Anteil von Faktor V/VI. Ausserdem enthält das Präparat Prothrombin - und Thrombinspuren. Die Convertinwirkung von 100 mg ACC-76 entspricht etwa der spezifischen Aktivität von 400 ccm Frischblut, (hinsichtlich Faktor VII).

Es wurde angenommen, dass diese Kombination der dem menschlichen Serum eigenen Acceleratorsubstanzen als Ersatz für später entwickelte gereinigte Faktoren IX, X und XI zur Eliminierung des unbekannten Accelerator-komplexes bei der quantitativen Prothrombinbestimmung herangezogen werden könne. Da die Prothrombinumwandlung in jedem Falle vollständig sein muss, konnte dies nur durch Zugabe aller Acceleratoren zum Reaktionsgemisch erreicht werden. Wir vertraten die Ansicht, dass die Spuren von Thrombin, die manche Chargen des Präparats enthalten, auf den Prothrombinspiegel wenig Einfluss hätten und lediglich die Überführung des Faktor V in Faktor VI bewerkstelligen würden. Durch Zusatz der verschiedenen Faktoren sollten die Bedingungen der Einphasenmethode so verändert werden, dass wirklich nur mehr ein Faktor variabel ist. Die Schwierigkeit, das Präparat in die Versuchsanordnung einzubeziehen, lag daran, dass es erstens die genannten Faktoren in unbekannter Konzentration, zweitens Spuren von Prothrombin und Thrombin enthielt. Für die Klinik standen keine poolierten Mengen dieses Präparates zur Verfügung. Für die Untersuchungen wurden immer dieselben Versuchspersonen herangezogen, deren Plasma Gerinnungswerte bekannt waren und gleich 100 % gesetzt wurden.

Jeder Untersuchung liegt dabei eine Serie von 5 - 10 Paralleluntersuchungen zu Grunde. Zur Orientierung wurde zunächst eine Anzahl von Vorversuchen durchgeführt, deren Ergebnisse wieder für die weiteren Untersuchungen zu Grunde gelegt wurden.

Von der Riebenschen Methode wurde übernommen:

Neben der Citratplasmagewinnung (1 : 9) die Plasmaverdünnung 1 : 30, die Prothrombinaktivierung bei Veronalacetat HCL Pufferlösung P_H 7,6 die Temperatur von 23°C für die Aktivierung und 37°C für den Eintritt der Gerinnung (2. Phase), ferner die 0,6 % Fibrinogenlösung und die Pufferlösung (4b) und die Thrombokinese CaCl₂ - Zubereitung (3 a₁).

Abänderungen betrafen vorerst die Anwendung von ACC-76 als Acceleratorzusatz und die Anwendung einer anderen Thrombokinese-Suspension (3 a₂). Zur Klärung des Wirkungsmechanismus von ACC-76 wurden nun nähere Untersuchungen ausgeführt. Es war dazu erforderlich, das Präparat ohne Fibrinogenzusatz anzuwenden.

A₁ Thrombokinese-CaCl₂ 30 Min. inaktiviert (56°) ACC 76:0,005 g/0,5cm³ physiol. NaCl Lösg. Plasma 1 : 30	B₁ Thrombokinese-CaCl₂ Mo1/40 30 Min. inaktiviert (56°) ACC 76:0,005 g/0,5cm³ physiol. NaCl-Lösg. Plasma 1 : 30	C₁ Thrombokinese-CaCl₂ Mo1/40 ACC 76:0,005 g/0,5cm³ physiol. NaCl-Lösg. Plasma 1 : 30
203 Sek. <u>+</u> 18,5 Sek.	146 Sek. <u>+</u> 5 Sek.	zu rascher Gerinnungseintritt, deshalb nicht verwertbar.
A₂ + Fibrinogen 0,6 ‰		C₂ + Fibrinogen 0,6 ‰
136 Sek. <u>+</u> 10 Sek.		94 Sek. <u>+</u> 9 Sek.
A₃ zusätzlich Puffer PH 7,6 Puffer PH 6,7	B₃ zusätzlich Puffer PH 7,6 Puffer PH 6,7	C₃ zusätzlich Puffer PH 7,6 Puffer PH 6,7
60 Sek. <u>+</u> 8,5 Sek.	62 Sek. <u>+</u> 4 Sek.	40 Sek. <u>+</u> 3 Sek.

TABELLE I

Vorversuche siehe Tabelle I:

1. Zugabe von Puffergemischen neben inaktivierter Thrombokinase und Calciumchloridlösung zu einer Plasma verdünnung.
 - A₁: 0,5 ccm Plasma verdünnung 1:30 und 0,5 ccm ACC-76 Lösung (10 mg pro ccm) in physiologischer Kochsalzlösung), 30 Sek. stehen lassen (Aktivierung). Anschliessend sofort 1 ccm Thrombokinase-Calciumchloridlösung 3a₁ zugeben und stoppen.
 - A₂: 0,5 ccm Plasma verdünnung 1:30 und 0,2 ccm Fibrinogenlösung 0,6 % und ACC-76 Lösung 30 Sekunden aktivieren. Anschliessend Thrombokinase lösung und stoppen.
 - A₃: Ansatz wie bei der klassischen Zweiphasenmethode, nur wurde nach Zugabe des Puffers 7,6 zur Plasma verdünnung noch 0,5 ccm ACC-76 Lösung zugegeben.
 - B_{1, 2, 3}: Es handelte sich um dieselbe Versuchsanordnung. Nur wurde die Thrombokinase geändert, indem Calciumchloridlösung 3a₂ zugesetzt wurde.
 - C₁: 0,5 ccm Plasma verdünnung 1:30 und 0,5 ccm ACC-76 Lösung. Nach 30 Sekunden Zugabe einer Mol/40 Calciumchloridlösung. Es trat praktisch spontane Gerinnung ein, so dass der Ansatz nicht zu verwerten war.
 - C₂: Nach vorheriger Zugabe von Fibrinogen zum Plasma bei derselben Versuchsanordnung, war die Gerinnungszeit deutlich verlängert.
 - C₃: Nach weiterer Zugabe von Puffer 7,6 zu Plasma und von Puffer 6,7 zu Fibrinogen wurde die Gerinnungszeit deutlich kürzer.
- Kritisch fiel bei den Versuchen auf, dass die günstigste Gerinnungszeit bei der Einphasenmethode C₃ erreicht wurde und dass diese Methode die geringste Schwankung aufwies. Folgender Nachteil lag dabei jedoch auf der Hand: Das ACC-76 wurde noch in einer derart unphysiologischen Konzentration verwendet, dass angenommen werden musste, dass die Prothrombinschwankungen überdeckt würden.
- Einfluss des P_H: Bei der normalen Einphasenmethode erfolgt die Bestimmung nicht in optimalem P_H. Nach Rieben ergaben Messungen mit der Glaselektrode bei verschiedenen Oxalatplasmen ein durchschnittliches P_H von 8,28 mit Schwankungen von $\pm 0,12$. Mateer (143) konnte bei Überprüfung

einer Eiweissreaktion nachweisen, dass bei Änderung einer Veronalpufferlösung von P_H 7,8 auf 7,55 die Empfindlichkeit der Reaktion nahezu verdoppelt wurde. Aus dieser Überlegung heraus wurde die Einphasenmethode im Vorversuch C₃ durchgeführt, die zwar hier einen sehr frappierenden Wert ergab, jedoch weiter überprüft werden musste.

2. Optimale Verdünnung von ACC-76:

In der nächsten Versuchsanordnung musste nun die optimale Verdünnung des ACC-76 erfasst werden, da die Konzentration noch unphysiologisch hoch war. Eine Verminderung der ACC-76 Menge zeigte hierbei eine deutliche Verkürzung von d. Gerinnungszeit während eine Vermehrung von ACC-76 eine geringe Verlängerung zur Folge hatte. Schliesslich zeigte sich in Parallelversuchen mit gleichzeitiger Verdünnung von Plasmen, dass die optimale Anwendungsbreite des ACC-76 unabhängig von der Plasmaverdünnung bei einer Dosierung von etwa 0,2 mg pro ccm lag. Den weiteren Versuchen wurde deshalb diese Menge zu Grunde gelegt.

STANDARDKURVE:

Die Standardkurven wurden wie folgt aufgestellt:

Normalcitratplasma wird mit Puffer 7,6 auf 1:10 verdünnt und damit die weiteren Bestimmungen durchgeführt. Man erhält den 100% - Wert. Durch Mischen des auf 1:10 verdünnten Plasmas mit demselben Volumen Pufferlösung erhielt man den 50% - Wert. Durch weiteres Verdünnen in analoger Weise erhielt man den 25% - Wert, usw.. Durch Eintragen der Gerinnungszeiten in ein doppelt logarithmisches Koordinatensystem erhielt man die Eichkurven.

Abb. 1 zeigte die Verdünnungsgeraden 2er stoffwechselgesunder Personen. Wir fanden, dass die ACC-76 Konzentration (ca. 10 mg/cm³), bei welcher die quantitative Prothrombinbestimmung vorgenommen wurde, das Resultat massgeblich beeinflusste. Wir konnten feststellen, dass die Verdünnungskurven bei logarithmischer Darstellung insgesamt einen nach oben konvexen bogenförmigen Verlauf nahmen und die Plasmaverdünnungen verschiedenen Prozentgehaltes undeutliche Abstufungen der Zeitwerte ergaben. Vor allen Dingen fiel uns die zusehends verkürzte Gerinnungszeit ab 25 % Plasmaverdünnung auf. Normal müsste bei entsprechender Verdünnung des Plasmas der Prothrombingehalt abnehmen und somit eine Verlängerung des Zeitintervalles bis zum Gerinnungseintritt ersichtlich sein.

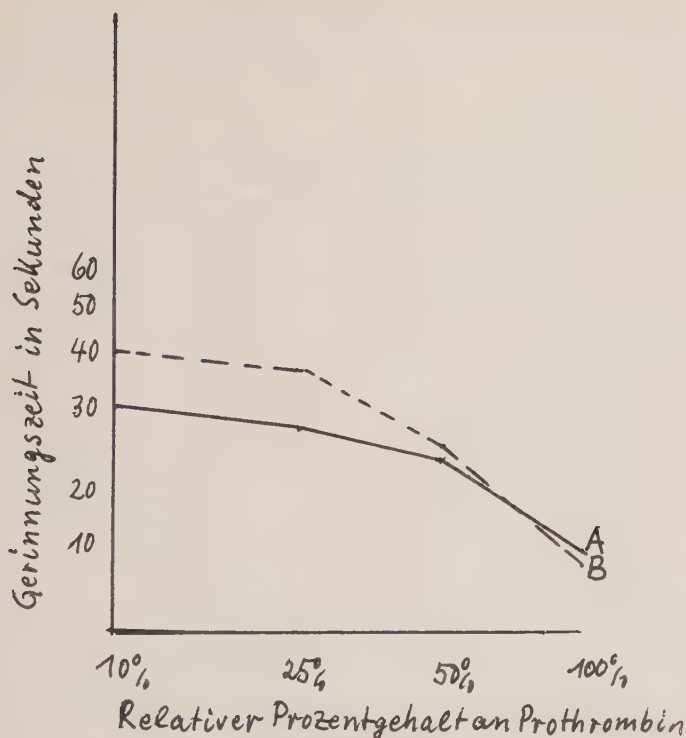


Abb. 1

Verschiedene Autoren (32) stellten fest, dass die Beziehungen zwischen Prothrombingerinnungszeit und Prothrombinkonzentration nicht linear seien. Bei Verdünnung von Normalplasma auf 50% steigt die Prothrombinzeit nicht auf das Doppelte an. Sie zeigte nur eine geringfügige Verlängerung, und würde erst bei einer Plasmaverdünnung auf 25-20% eine deutliche Zunahme der Gerinnungszeit aufweisen. So wirkt sich bei der Zeitmessung ein Fehler von 1 Sekunde bei hohen Plasmakonzentrationen und kurzen Gerinnungszeiten stark aus, was besonders im doppelt logarithmischen Koordinatensystem zu ersehen ist. Auch bei weiterer Verdünnung des ACC-76 auf etwa 1 mg pro ccm fand sich noch eine gleichsinnige Kurvenzeichnung des Diagramms vor, allerdings mit einer viel geringeren Abweichung (Abb. 2).

- 1 mit 0,3% Fibrinogen
2 " 0,6% "
3 ohne Au76

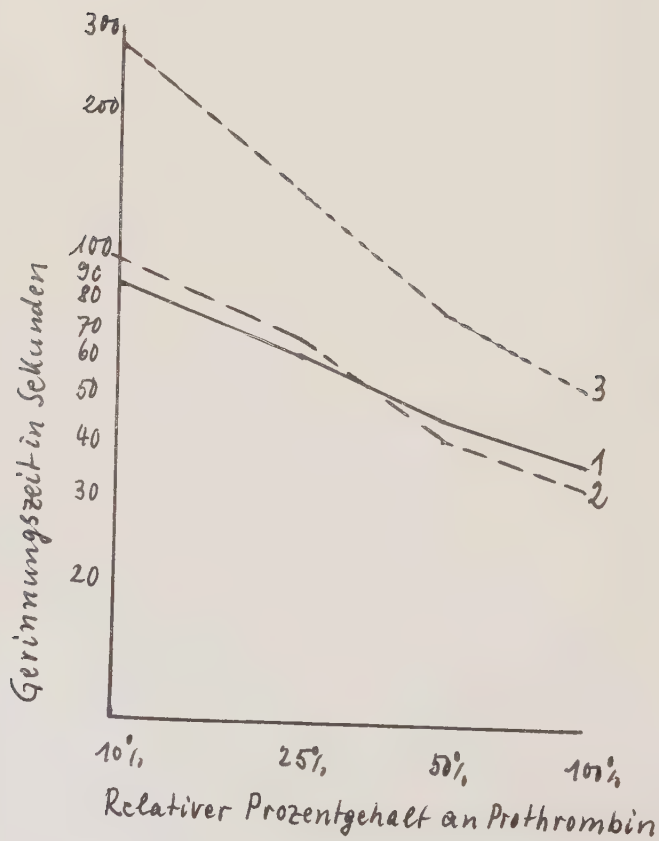


Abb. 2

Wie zu ersehen war, machte sich auch ein Einfluss verschiedener Fibrinogenkonzentrationen auf die Verlaufsrichtung der Geraden deutlich bemerkbar. Es musste auf eine völlig gleichmässige Dosierung des Accelerator- und Fibrinogenzusatzes geachtet werden, weil die Einphasenmethode im Gegensatz zum Zweiphasenverfahren auf jede Veränderung mit einer Verkürzung oder Verlängerung der Gerinnungszeit anspricht. Trotzdem die Anwendungsmöglichkeit von ACC-76 1 mg pro ccm gegenüber 10 mg pro ccm verbessert wurde, zeigte sich dennoch ein ungleichmässiges Einwirken desselben auf Plasmen und Personen, bei denen Antikoagulantien angewendet wurden. Wir verdünnten deshalb das ACC-76 auf etwa 0,2 mg pro ccm. Durch die Verdünnung des ACC-76 kam es zu einer Verlängerung der Gerinnungszeit um wenige Sekunden. Der Fusspunkt der Standardkurve bei der quantitativen Prothrombinbestimmung lag bei 36 Sekunden. Es waren hier ebenfalls Unregelmässigkeiten im Kurvenverlauf festzustellen. Anscheinend waren im Acceleratorenpräparat zusätzliche Substanzen enthalten, die als Hemmkörper unterschiedlich den Gerinnungseintritt beeinflussten. Um grösseren Schwankungen der Gerinnungszeiten aus dem Wege zu gehen, stellten wir das ACC-76 in einer Verdünnung von 10 mg pro cm^3 20 Minuten in ein Wasserbad von 50°C . Durch das Erwärmen wurde das Acceleratorenngemisch zugleich einer Stabilitätsprüfung gegenüber Temperatur unterzogen.

In Abbildung 3 und 4 sehen wir den Kurvenverlauf 2er Tromexanplasmen, die mit der Zweiphasenmethode einen Prothrombingehalt von weniger als 30 % aufwiesen.

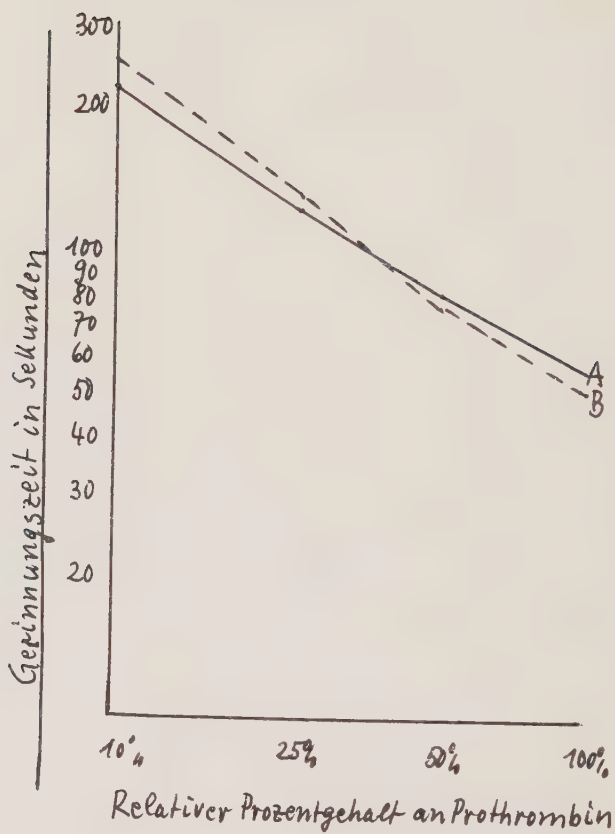


Abb. 3

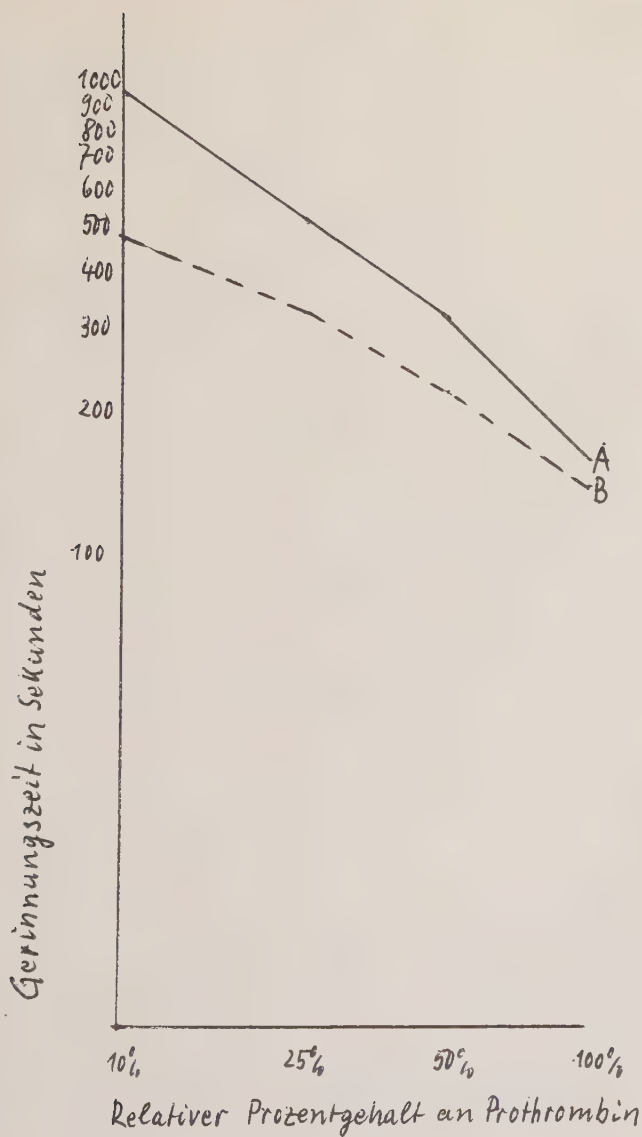


Abb. 4

VERDÜNNUNGSMITTEL:

Es wurde auf die Unzuverlässigkeit einer Bestimmung von Plasmen hingewiesen, die mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt wurden. Auch wir sahen bei den Vorversuchen eine zunehmende Schwankungsbreite von Normalplasmen bei steigender Verdünnung (1:30, 1:50), jedoch nur dann, wenn zu dieser Verdünnung keine Fibrinogenlösung hinzugegeben wurde, oder der Reaktionsablauf ohne P_H -Einstellung erfolgte. Wir benutzten die Zweiphasenmodifikation nach Schultze und pipettierten anstelle von 0,2 ccm Fibrinogenlösung im Ansatzröhrchen dieselbe Menge Kochsalzlösung zu Puffer 6,7. Nach über 11 Minuten trat noch keine Gerinnung ein. An dieser Stelle dürfte eine Feststellung Erwähnung finden, die auch Rieben machte, dass nämlich Plasmen, um das 50-fache verdünnt, Fibrinogenkonzentration aufwiesen, die praktisch kaum in Erscheinung traten. Frühere experimentelle und klinische Untersuchungen wiesen darauf hin, dass die Fibrinogenkonzentrationen in verhältnismässig weiten Grenzen (0,2 - 0,75 g %) schwanken können ohne die Gerinnung messbar zu ändern (72). Barcroft, Stanley, Brown und Quick wiesen darauf hin, dass die Zugabe von geringen Mengen Fibrinogen zum Plasma keinen eindeutigen Einfluss auf die Gerinnungszeit hat (11). Wir konnten ersehen, dass Fibrinogen notwendig ist und nicht nur eine passive Rolle im Reaktionsablauf hat. Wie bereits hervorgehoben wurde, wird ja durch die Verdünnung des Plasmas auch die Fibrinogenkonzentration herabgesetzt und so war es gerechtfertigt, durch Zugabe desselben diese Fehlerquelle zu beseitigen.

EINFLUSS DES P_H AUF DIE GERINNUNGSZEIT:

Durch Vereinfachung der Ausführung in einem Arbeitsgang (gegenüber der Zweiphasenmethode) wurde der Ablauf beider Phasen in einem P_H notwendig und die gemessene Gerinnungszeit stellte somit die Resultante beider Phasen dar. Dabei nimmt die Thrombinbildung, die erste Phase, den längeren Zeitanteil ein. In Anlehnung an Kollers Faktor VII Bestimmung (115) nahmen wir nun eine direkte Verdünnung des Plasmas, Fibrinogens und ACC-76 in Veronalpufferlösung von P_H 7,6 vor, um einerseits eine genaue Verdünnung zu gewährleisten, andererseits aber doch das P_H des Lösungsmittels zu berücksichtigen. Somit wurde eine zusätzliche Verdünnung durch eine Pufferlösung oder Kochsalzlösung ausgeschlossen.

TECHNIK:

0,1 ccm Plasmaverdünnung 1:10 in $P_{H\ 7,6\ 6,7}$, Nall + 0,5 ccm $P_{H\ 7,6}$

0,1 ccm Fibrinogenlösung 0,3 % in $P_{H\ 7,6\ 6,7}$, Nall-Lösung

0,1 ccm ACC-76 von etwa 0,2 mg pro ccm in $P_{H\ 7,6\ 6,7}$ NaCl - Lösung

nach 30 Sekunden: Zugabe von

0,1 ccm Thrombokinase, nach weiteren 30 Sekunden

0,1 ccm Calciumchlorid Mol/40

Aus den Vorversuchen, bei denen die Prothrombinzeitbestimmung phasengetreuen mit verschiedenem $P_{H\ 7,6}$ vorgenommen wurde, durften wir schliessen, dass die Prothrombinaktivierung bei $P_{H\ 7,6}$ die Fibrinbildung bei $P_{H\ 6,7}$ optimal verlief. Keine grossen Schwankungen der Zeitdifferenzen zeigten Verdünnungsreihen in $P_{H\ 7,6\ 6,7}$ und physiol. NaCl-Lösung, der 0,5 ccm $P_{H\ 7,6}$ zugegeben wurden, solange sie bei 23°C angesetzt wurden, (Abb. 5 mit ACC-76, Abb. 6 ohne ACC-76). Die Einstellung auf $P_{H\ 7,6}$ hat sich somit für den Reaktionsablauf am günstigsten erwiesen. Schultze (206) konnte zeigen, dass mit zunehmender Alkalität die Thrombinausbeute abnimmt, während sich die Umwandlungszeit weiterhin verkürzt. Nach ihm wird offenbar eine bei $P_{H\ 7,1}$ bis 7,6 optimal verlaufende Fermentreaktion bei alkalischer Reaktion durch eine chemische Hydrolyse überlagert, die ebenfalls zur Freilegung von Thrombin führte. Versuche am gereinigten System stützen die Annahme einer alkalischen Hydrolyse neben einer enzymatischen, für die das Temperaturoptimum bei 37°C charakteristisch ist.

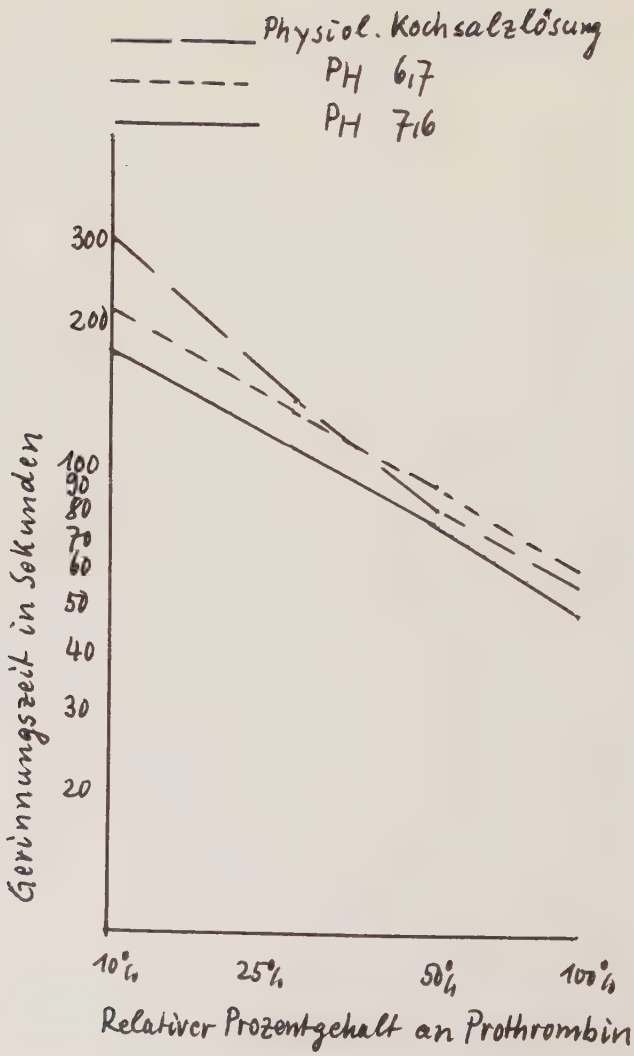


Abb. 5

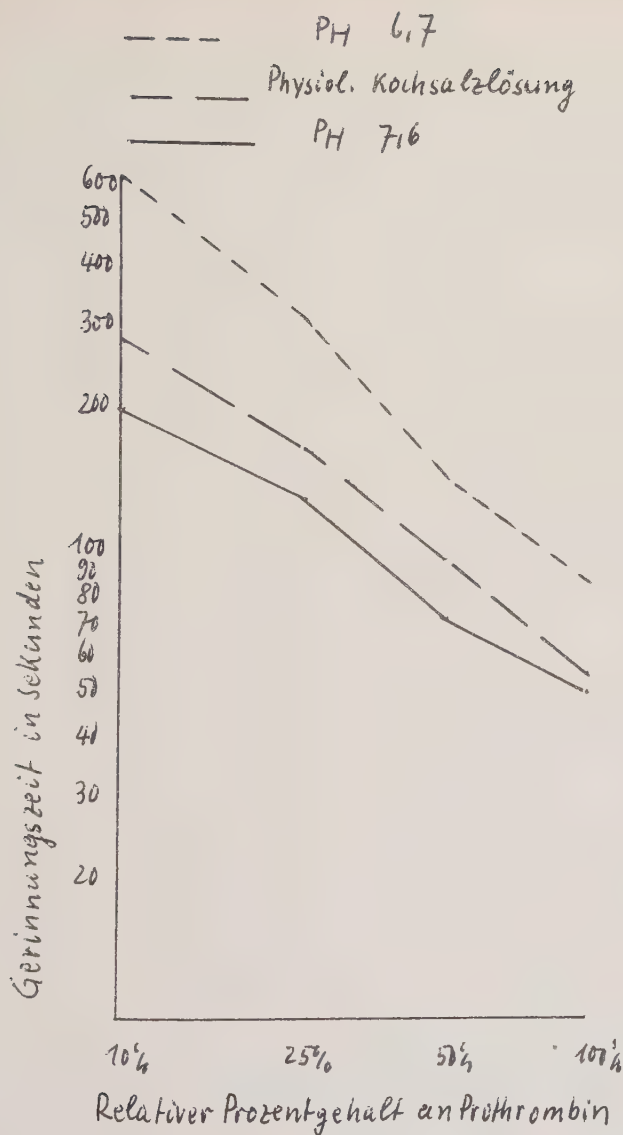


Abb 6

ABHÄNGIGKEIT VON DER TEMPERATUR:

Die Abhängigkeit der Prothrombinzeitbestimmung von der Temperatur wurde verschiedentlich erörtert. Die Temperatur hat einen sehr grossen und wie Legler (121) zeigen konnte, einen gesetzmässigen Einfluss auf die Gerinnungszeit. Die quantitativen Prothrombinbestimmungen wurden deshalb so durchgeführt, dass das zu untersuchende Plasma mit den Vorratslösungen von Thrombokinas CaCl_2 , Fibrinogen und ACC-76 in ein Wasserbad von 37°C gestellt wurden. Um ein Abkühlen dieser Substanzen beim Überpipettieren zur Plasmaverdünnung zu vermeiden, wurden die Pipetten in die betreffenden Reagenzgläser dieser Lösungen gestellt. Damit wurde verhindert, dass durch eine Pipette, die nicht 37°C warm war, eine kurzzeitige Abkühlung der entsprechenden Lösungen eintrat.

EINFLUSS AUF DIE AKTIVIERUNGSZEIT NACH ZUGABE VON ACC-76:

Die Gerinnung wird eingeleitet, wenn nur wenige Prozent des Prothrombin in Thrombin umgewandelt sind. Es stand zur Frage, ob nur der Prothrombinanteil erfasst wird, der innerhalb der Gerinnungszeit durch das zugegebene Acceleratorenngemisch und durch die Thrombokinasaktivität in Thrombin überführt worden ist oder in welchem Verhältnis dieses Prothrombin zum Gesamtprothrombin steht, das bei der Zweiphasenmethode erfasst wird (180, 203). Die völlige Umwandlung von Prothrombin in Thrombin soll in der Grössenordnung von Minuten erfolgen.

Um irgendwelche Unterschiede im Prothrombin - Thrombinumbau in Bezug auf die ACC-76 und Thrombokinasewirkung festzustellen, nahmen wir zu verschiedenen Zeiten Prothrombinbestimmungen vor. Wir nahmen Plasmaverdünnungen 1:10 und 1:12,5. Die Thrombokinas suspension wurde einmal 30 Sekunden, das andere Mal 3 Minuten nach der Zugabe von ACC-76 und jeweils 30 Sekunden nachher CaCl_2 Mol/40 hinzugefügt. Wie Abbildung 7 und 8 zeigen, waren die Änderungen der Gerinnungszeiten, die während dieser Zeitspanne auftraten unwesentlich. Bei der Unterschiedlichkeit der Plasmaverdünnungen und der langen Verweildauer, die diese Plasmen der Einwirkung von ACC-76 und Thrombokinas ausgesetzt waren, sind keine grösseren Zeitdifferenzen eingetreten.

Wir kamen zu der Anschauung, dass es sich bei diesen Schwankungen um Aktivitätsänderungen des Acceleratorenngemisches und der Thrombokinas handeln dürfte. Dabei hielten wir es für möglich, dass durch Thrombinspuren des ACC-76 die Latenzperiode, die der Thrombinbildung vorhergeht, verkürzt

und die Schwellenkonzentration früher erreicht wurde. Diesen Spuren von Thrombin kämen demnach eine Acceleratorwirkung zu. Diese Vermutung würde in Analogie zu Beobachtungen (211, 212) an neueren Untersuchungen stehen, nach denen dem Thrombin nach Verimpfung eine umwandlungsfördernde Wirkung zukommt. Schultze (206) beobachtete, dass diese Wirkung des Impfthrombins nicht von der im Gerinnungstest ermittelten Titerhöhe, sondern von seiner proteolytischen Aktivität abhängt. Es stellt ein Vorgehen dar, das auch den Ablauf biologischer Ansätze beschleunigt (232). Jedes Plasma hat seine eigene individuelle Reaktionsfähigkeit. Diese Beobachtungen machte Schultze, der feststellte, dass trotz gleichartiger Reinigung das aus verschiedenen Blutentnahmen isolierte Prothrombin in konzentrierter Citratlösung sich nicht gleich schnell in Thrombin umwandelte, und die Wirkungsweise der Impfthrombine auf gelöstes Prothrombin sich ebenfalls unterschiedlich voneinander verhielt.

Plasmaverdünnung 1:10 Plasmaverdünnung 1:12,5

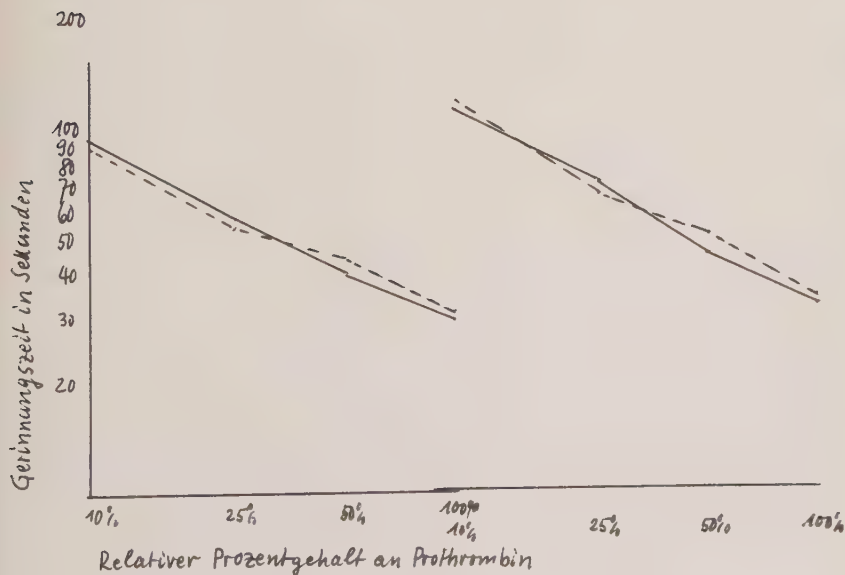


Abb. 7

Abb. 8

VERDÜNNUNGEN VON PLASMEN MIT PUFFERLÖSUNG 7,6 6,7 UND KOCHSALZLÖSUNG:

Der Feststellung, in wie weit prinzipielle Unterschiede zwischen unverdünnten und verschiedenen verdünnten Plasmen bestehen, war vor allem deshalb Bedeutung beizumessen, weil sich die bisherige Einphasenmethode auf das Verhalten des Prothrombinkomplexes bezog. Wie aus dem Gerinnungsschema ersichtlich ist, hemmen Antithrombine die Blutgerinnung. Es sollte untersucht werden, ob die Plasma verdünnung 1:10 in P_H 7,6 die bis zu einem gewissen Grade ein unphysiologisches Milieu darstellt, ausreicht, den Antithrombintiter auszuschalten. Eine Verlängerung der Gerinnungszeit muss nicht unbedingt auf einer Verminderung der Prothrombinkonzentration beruhen, sondern kann auch z.B. durch einen höheren Heparin gehalt hervorgerufen werden (1, 57).

In Abbildung 9 und 10 wurden von den zu untersuchenden Normalplasmen die Verdünnungsgeraden von 1:7,5, 1:10, 1:12,5, 1:20 und 1:30 ermittelt. Es sollte untersucht werden, ob die verschiedenen Verdünnungen die gleiche Steigung (Neigungswinkel) haben und welche zeitlichen Unterschiede der Plasmagerinnungen sich einstellten. Bei der Betrachtung der Kurve fiel uns auf, dass im allgemeinen ein geradliniger Verlauf festzustellen war, aber nur die Geraden von 1:30 und 1:20 wiesen Parallelität auf. Bei den Verdünnungen 1:7,5, 1:10 und 1:12,5 änderte sich der Neigungswinkel geringgradig und es bestanden Anzeichen eines bogenförmigen und zwar nach oben konkaven Linienvlaufes. Nach Legler (122) enthielt Plasma mehr Hemmstoff, je grösser seine Steigung war, oder, je mehr es bei niederen Werten der Prothrombinkonzentration in eine gebogene Linie überging. Die Verdünnungsgeraden von 1:7,5 - 1:12,5 stellten nicht in ihrem ganzen Bereich eine Gerade dar, sondern gingen nach ihren Mittelwerten, die noch gesetzmässig verliefen, in einen bogenförmigen Verlauf über. Dies liess sich bei logarithmischer Darstellung ersehen, da durch Verschiebungen der Achsen die Kurven zur Deckung gebracht werden konnten. Die Gerinnungszeiten der Verdünnung 1:10 waren kürzer als die der Verdünnung 1:7,5. Auf Grund dessen konnten wir annehmen, dass die 1:10 Verdünnung eventuell am kritischen Punkt liegen könnte, bei dem ein erhöhter Antithrombintiter des Plasmas keinen Einfluss mehr auf die Gerinnungszeit haben würde.

Mit Acc 76

Plasma verdünnung

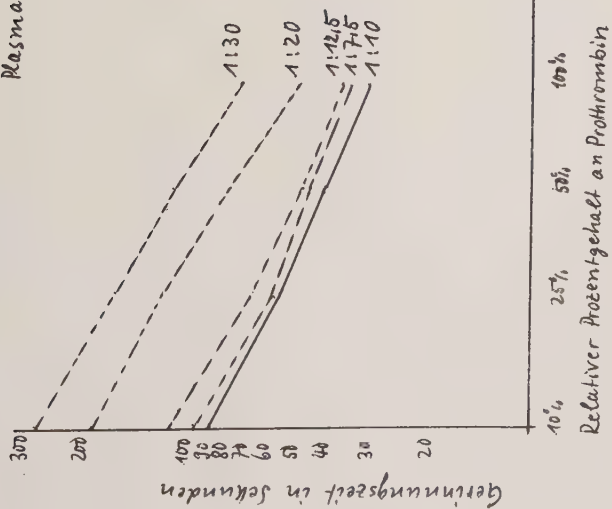


Abb. 9

Ohne Acc 76

Plasma verdünnung

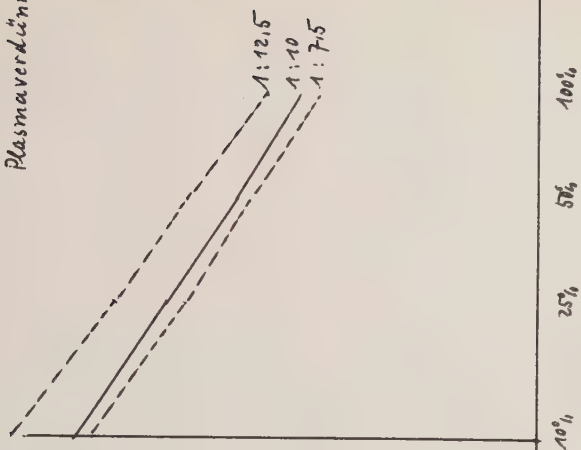


Abb. 10

Koller gab an, dass Hyperprothrombinämien dem Nachweis entgehen könnten, wenn das Plasma nicht verdünnt würde, während Quick (178) vor der Feststellung einer Hyperprothrombinämie bei Verwendung von Plasmaverdünnungen warnt. Die Einphasenmethoden zeigen sich bei der Bestimmung von Hyperprothrombinämien unzuverlässig. Neben einer starken Ansprechbarkeit auf Acceleratoren dürfte im wesentlichen der Kurvenverlauf eine Rolle spielen, dessen Abweichungen sicher auch durch den Antithrombintiter eine Beeinflussung erfährt.

AUFARBEITUNG VON PLASMA, DAS 24 STUNDEN IM KÜHLSCHRANK STAND:

Es zeigte sich dabei, - wenn man eine modifizierte Einphasenmethode durchführte - dass die Gerinnungswerte insgesamt höher lagen aber doch so ziemlich linear verliefen (Abb. 11, 1). Nach Zugabe von Fibrinogen, (Abb. 11, 2) lagen die Werte niedriger und nach Zugabe von ACC-76 (Abb. 11, 3) kam es zu einer Abflachung des Steigungswinkels, wobei der Knick, der mit Fibrinogen, ohne ACC-76 auftrat (Abb. 11, 2), nicht ganz ausgeglichen wurde. Die Gerinnungszeit war aber verkürzt. Daraus ergibt sich, dass eine Aufbewahrung von Citratplasma im Eisschrank ohne weiteres möglich ist. Es empfiehlt sich aber, in jedem Falle das zu untersuchende Plasma möglichst frisch der Gerinnungszeitbestimmung zuzuführen.

- 1 Plasma ohne Acc76, ohne Fibrinogen
 2 " " " , mit "
 3 " mit " , mit "

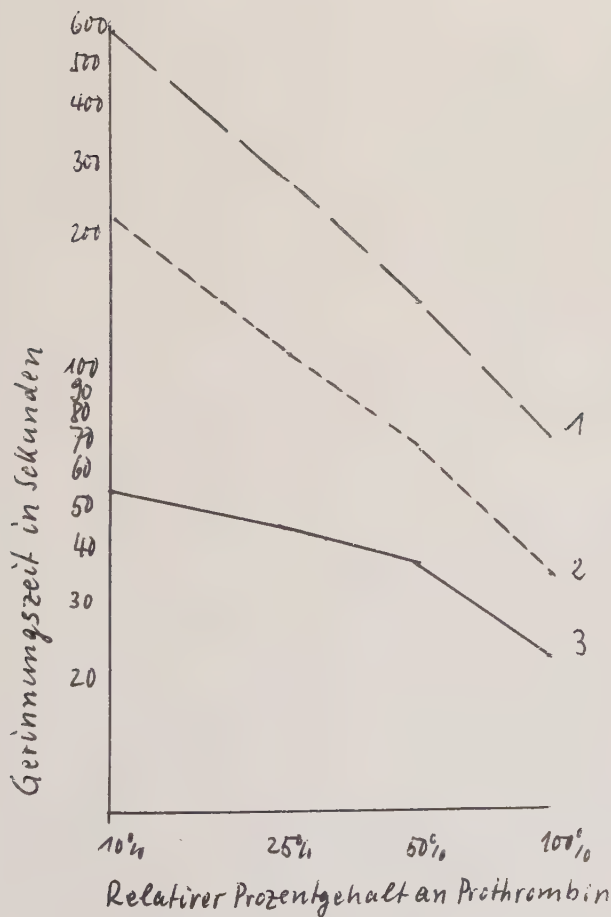
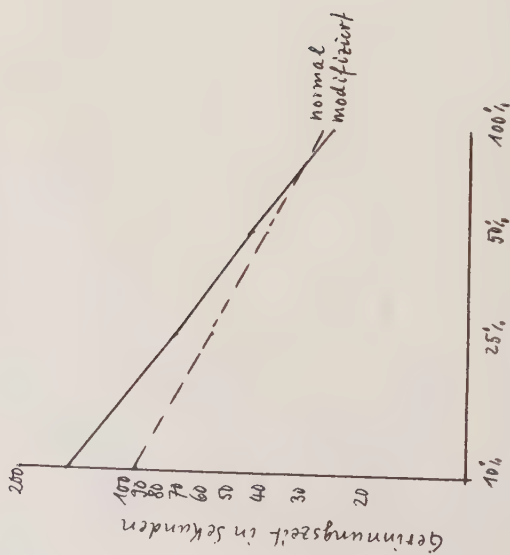


Abb. 11

Zweiphasenmethode



Relativer Prozentgehalt an Protrombin

Abb. 12

Einphasenmethode

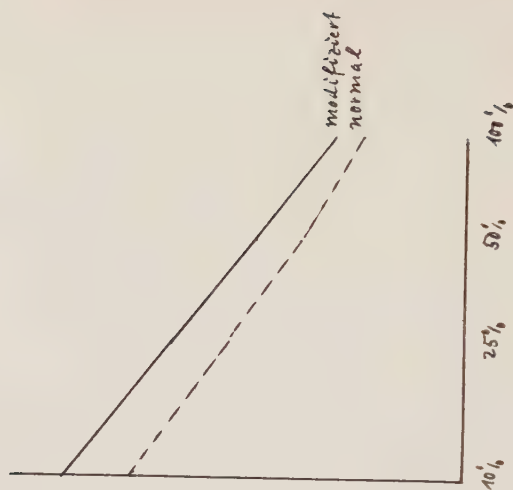


Abb. 13

Abbildung 12, 13 zeigen die Eichkurven der zum Vergleich herangezogenen normalen und modifizierten Ein- und Zweiphasenmethoden, die mit Reagenzien-Behringwerke durchgeführt wurden.

ZUSAMMENFASSUNG:

Als quantitative Prothrombinbestimmung hatte man ursprünglich die Methode von Rieben angesehen. Eine Abhängigkeit von den Faktoren V und VII, denen im physiologischen Blutgerinnungssystem eine nicht unbeträchtliche Funktion zukommt, wurde alsbald erkannt. Die Faktoren wurden isoliert und zur quantitativen Prothrombinbestimmung im System nach Rieben in einer Modifikation von Schultze - Schwick hinzugefügt. Ein weiterer Accelerator, der bei der Prothrombingenese eine Rolle spielt, ist der Stuart-Prower-Faktor (XI).

Es wurde ein methodischer Vorschlag für eine quantitative Prothrombinbestimmung unterbreitet mit der Technik:

0,1 ccm Fibrinogenlösung 0,3 % in $P_{H\ 7,6}$

0,1 ccm ACC-76 (0,2 mgr/ccm gelöst in Veronalpufferlösung vom $P_{H\ 7,6}$)

0,1 ccm Gewebsthrombokinase und nach 30 Sekunden

0,1 ccm Calciumchloridlösung Mol/40.

Die Bestimmung des Prothrombins erfolgt bei 37°C. Für die Durchführung werden standardisierte, stabile Trockenreagenzien empfohlen. Es lag nahe, ein im Handel befindliches Präparat mit den Faktoren V - VII, dem Stuart-Prower-Faktor und Thrombinspuren als Acceleratorzusatz zu einer mehr spezifischen Prothrombinbestimmung zu gebrauchen. Für die Klinik ist zu diesem Zweck die Methode derzeit noch nicht ideal, weil die Einzelchargen von ACC-76 bisher nicht ganz konstant sind. Es dürfte sich ebenfalls auch empfehlen, Faktor V anzureichern und den kleinen Prothrombingehalt des für klinische Therapie Zwecke ausgerichteten Präparates noch zu verkleinern. Bei Poolierung einer genügenden Menge eines solchen Präparates liesse sich damit noch das Riebenprinzip für die Prothrombinbestimmung spezifischer gestalten.

Die Thrombocytenfaktoren spielen eine relativ bescheidene Rolle, wenn Gewebsthrombokinase zugegeben wird. Es konnte daher auf Zugabe von Thrombocyten-Extrakten zu einem ACC-76 Präparat für eine spezifischere Prothrombinbestimmung verzichtet werden.

LITERATUR

- 1) Aggeler P.M.:
Lucia S.P.: Proc.Soc.exp.Biol.Med. 38, 11, 1938
- 2) Aggeler P.M.:
Lucia S.P.: Blood 1, 220, 1946
- 3) Aggeler P.M., White S.G.
Glendening M.D., Page Proc.Soc.exp.Biol.Med. 79, 692, 1952
E.W., Leake T.B., Bates G.
- 4) Aldehoff P., Kruchen G.
Weidenbach H.: DMW 45, 77, 1952
- 5) Alexander B., de Vries A.
Goldstein u. Landwehr: J.clin.Invest. 29, 881, 1950
- 6) Anschütz: Ber.Chem.Ges. 36, 463, 1903
- 7) Asplund, Borell, Holm-
green: Z. Mikrosk.anat.Forschg. 46, 16, 1939
- 8) Astrup T., Darling S.: Acta physiol.scand. 5, 13, 1943
- 9) Astrup T., Owren: adv.Enzymol. 10, 1, 1950
- 10) Astrup T., Permin M.: Nature 159, 681, 1947
- 11) Barcroft, Stanley,
Brown, Quick: Amer.J. of Surgery 28, 647, 1936
- 12) Baumüller E.: Med.Klin. 47, 161 - 1952
- 13) Beaumont J.L., Gerbaux A.
Lenègre J.: Pr.med. 59, 1665, 1951
- 14) Begemann H.: Mat.Med.Nordmark V/12, 1953
- 15) Biedermann F.: DMW 78, 304, 1953
- 16) Biggs R., Douglas,
Mc Farlane u.a.: Brit.med.J., 4799, 1378, 1952
- 17) Bingham J., Mayer,
Pohle: Amer.med.Sci. 202, 563, 1941

- 18) Bjerkelund Ch.: Lancet 264, 260, 1953
- 19) Blobel: Dissertation Greifswald 1892
- 20) Boggero C.: Policlinico 60, 1237, 1953
- 21) Bordet J., Delange L.: Berl.Löin.Wochschr. 51, 497, 1914
- 22) Bordet J.: C.R.Soc.Biol. 82, 896, 1919
- 23) Bordet J., Gengou O.: Ann.Inst.Pasteur 18, 26, 1894
- 24) Bourde G.: Arch.Mal.Coeur, 45, 611, 1953
- 25) Brinkhaus K., Smith,
Warner, Seegers: Amer.J.Physiol. 125, 683, 1939
- 26) Brinkhaus K.: Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 66, 117, 1947
- 27) Bronstein M., Witkind E.: Am.J.Med. Sci. 222, 677, 1951
- 28) Burstein M., Guinant A.: Rev.d/Hemat. 8, 45, 1953
- 29) Butt, Allen, Bollmann,
Barker, Mines, Waugh: Proc.Mayo Clinic 16, 388, 1941
- 30) Bürker K.: Münch.med.Wschr. 51, 1189, 1904
- 31) Campbell, Roberts W.
Smith, Link: J.Biol.Chem. 136, 47, 1940
- 32) Campbell H., Schmith,
Roberts, Link: J.Biol.Chem. 138, 1, 1941
- 33) Chargaff E., Ziff., Moore J.Biol.Chem. 136, 689, 1940
- 34) Christensen L., Mc Lean: J.gen.Physiol. 28, 559, 1945
- 35) Copley A., Robb: Am.J.Physiol. 133, 248, 1941
- 36) Crafoord C.: Acta chir.scand. 79, 407, 1937
- 37) Cramer R., Flückiger, Gasser,
Koller, Leologer, Matter: Acta haematol. 10, 65, 1953 .
- 38) Creveld S., van Paullsen: Lancet 262, 23, 1952
- 39) Dam H., Sondergaard: Acta physiol.scand. 31, 376, 1954
- 40) Daniel W.: Wien.med.Wchr. 102, 667, 1952

- 41) Deutsch E.: Die Hemmkörper-Hämophilie,
Springerverlag 1950
- 42) Deutsch E.: Blutgerinnungsfaktoren, F. Deutike
Wien 1955
- 43) Dickinson: Journ. of Physiol. 9, 1890
- 44) Donner M.: Med. Klinik 30, 47, 1952
- 45) Douglas Q., Brown: Brit. Med. J. 1, 412, 1952
- 46) Duff, Linmann, Arber: J. Michigan Med. Soc. 49, 1428, 1950
- 47) Dyckerhoff H., Grünewald: Biochem. Z., 315, 124, 1943
- 48) Emmenegger H., Lüscher: Helv. Phys. Pharm. Acta 12, C₁₃, 1954
- 49) Fahey, Olwen, Ware: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 67, 491, 1948
- 50) Fantl P., Nance M.: Nature 158, 708, 1946
- 51) Favre-Gilly J., Ithier,
Balc, Lyon: Lyon chri. 47, 825, 1953
- 52) Fell, Ivanovic,
Johnson, Seegers: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 85, 199, 1954
- 53) Fehmers G., Mastenbroek: Nderl. Tijdschr. Geneesk. 2138, 1942
- 54) Feissly R., Eonowicz: Schweiz. med. Wchr. 76, 274, 1946
- 55) Feissly R.: Helv. med. Acta 8, 823, 1941
- 56) Ferguson H.: Science 97, 319, 1943
- 57) Ferguson J., Glazko: Am. J. Physiol. 134, 46, 1941
- 58) Ferguson J., Glazko: J. Lab. Clin. Med. 26, 1559, 1941
- 59) Fiechter B.: Schweiz. Med. Wschr. 70, 259, 1941
- 60) Fonio A.: Acta Haematol. 6, 207, 1951
- 61) Franz, Friedrich: Arch. exp. Path. u. Pharm. 49, 342, 1903
- 62) Fresenius: In. Diss. Bonn., 1902
- 63) Galleone, Romagnolo: Schweiz. med. Wschr. 625, 1948

- 64) Glaszko A., Scott: J.Gne.Physiol. 24, 169, 1940
- 65) Govaerts P., Gratia: Rev.belg.Sci.med. 3, 689, 1931
- 66) Graham J.B., Hougie C.
Zit.in.Bachmann, Duckert,
Geiger, Baer P. u. Koller: Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica
1, 169 - 194, 1957
- 67) Green T.W.: Virg.Med.Monthly 80, 545, 1953
Ref.i.J.Amer.Med.Assoc. 153, 1404, 1953
- 68) Groedel F.M.: DMW 5, 76, 1951
- 69) Grüning W.: Klin.Wschr. 921, 1941
- 70) Grüning W.: Pflügers Arch. 247, 292, 1943
- 71) Hallmann: Klin.Chemie und Mikroskopie 1953
- 72) Halse Th.: Med.Klin. 42, 20, 1947
- 73) Halse Th.: Pharmazie 2, 253, 1947
- 74) Halse Th.: Fibrinolyse 1948
- 75) Halse Th.: DMW Wschr. 15, 76, 1951
- 76) Hammarsten O.: Pflüg.Arch. Bd. 22
- 77) Hammarsten O.: Nova Acta reg.soc.scient.Upsal.Ser.
III, 1875
- 78) Hammarsten O.: Z.g.physiol.Chemie Bd. 22, S. 103 -
126, 333-395, 1896/1897
- 79) Hammarsten O.: Hoppe - Seyler, Bd. 19, 1894
- 80) Haycraft J.B.: Arch.exp.Path.u.Pharm. 18, 209, 1884
- 81) Heilmeyer L.: Handbuch d.inn.Med.Blut-u.Blutkrank-
heiten Springer Verlag 1951
- 82) Heilmeyer L.: Lehbuch d.spez.Path.Physiol. 6.Aufl.
1945 Jenau Verl.f.Gust.Fischer
- 83) Held E.: Arch. Gynäkol. 180, 86-119, 1951
- 84) Hellem A.J.: Nord.med.48, 1558 (1952) Ref.J.Amer.
Med.Assoc. 151, 867 (1953)

- 85) Honorato C.R.: Am.J.Physiol. 150, 371, 1947
- 86) Horn Z., Borsodi L.: Schweiz.med.Wschr. 1068, 1948
- 87) Howell W.H.: Arch.internat.Med. 13, 76, 1914
- 88) Howell W.H., Holt E.: Am.J.Physiol. 47, 328, 1918
- 89) Howell und Holt: Amer.J.Physiol. 63, 434, 1922
- 90) Hugentobler F., Wunderly: Helv.physiol.acta 7, 321, 1949,
Vierteljahr.Schr.naturforsch.Ges.Zürich
34, 256, 1949
- 91) Jacox R.F.: J.Clin.Invest. 28, 492, 1949
- 92) Jacox R.F., Bays R.F.: Blood 5, 313, 1950
- 93) Jaques L., Lee U., Trevoy L.
Spinks J.: Proc.Soc.Exp.Biol.A.Med. 74, 151, 1950
- 94) Jensen J.: DMW 381, 1947
- 95) Johnson S.H.
Smathers W., Schneider: Amer.J.Physiol. 170, 631, 1952
- 96) Jorpes E.J.: Biochem.J., 29, 1817, 1935
- 97) Jorpes E.J.: acta med.scand. 88, 427, 1936
- 98) Jorpes E.J.: Naturwiss. 23, 196, 1935
- 99) Jorpes E.J.: Z.physiol.Chem. 244, 253, 1936
- 100) Jorpes, Hoolmgreen und
Wilander: Z.Mikrosk.anat.Forsch. 42, 279, 1937
- 101) Jürgens J.: Dtsch.Arch.f.klin.Med.200, 66, 1952/53
- 102) Jürgens J.: Klin.Wschr. 24/25, 216, 1947
- 103) Jürgens R., Studer A.: Schweiz.med.Wschr. 28, 1119-1121, 1952
- 104) Jürgens J.: Verh.Ges.inn.Med.58, Kongress 1952
- 105) Jürgens J.: 5th Internat.Congr.Haemat.Paris 1954
Zit.Nr. 42
- 106) Karrer P.: Schweiz.med.Wschr. 21, 537, 1940

- 107) v. Kaulla K.: DMW 77, 723, 1952
- 108) v. Kaulla K.: Schweiz.med.Wschr. 313, 1947
- 109) Kingsley C.S.: Nature 173, 723, 1954
- 110) Klein P.D., Seegers W.H.: Blood, 5, 742, 1950
- 111) Koller F.: Pr.méd., 60, 67, 1952
- 112) Koller F.: Méd.Hyg. 10, 339 - 341, 1952
- 113) Koller F.: Vortrag: 4. Kongr.d. "European Society of Haematology", Amsterdam, September 1953
- 114) Koller F.: Vortrag: 20. Tagung d.dtsch.Pharmak. Ges. Bonn, Oktober 1953
- 115) Koller, Leolinger A.
Duckert F.: Literaturzusammenstellung
Acta Haemat. 6, 1, 1951
- 116) Koller, Leolinger A.
Duckert F.: Rev.Haematol. 7, 156, 167, 1952
- 117) Koller, Leolinger
Duckert, Hu-Wang H.: Dtsch.med.Wschr. 77, 528-533, 1952
- 118) Krüger F.: Arb.d.Pharm.Inst.zu Dorpat, Bd.XIII, 13, 64, 1896
- 119) Kudryashov B.A.: Doklady Akad.Nauk.SSSR, 60,1469,1948
- 120) Laki K.: Stud.Inst.Med.Chem.Szeged. 3,5,1943
- 121) Laki K., Lorand L.: Expev. 2, 412, 1946
- 122) Legler R.G.: Helvet.Chim.Acta 26, 1512/1673,1943
- 123) Lehmann J. Sv.Läkartidn, 16, 1942
- 124) Lenggenhager K.: üb.d.Entst., Erkenn.u.Vermeidung p-Postoper.Fernthrombose, Thieme-Verlag, 1948
- 125) Lenggenhager K.: Helvet.Med.Acta 1, 527, 1934-35

- 126) Lenggenhager K.: Weit, Fortschritte i. d. Blutger. Lehre
2. Auflage, Thieme, Leipzig 1949
- 127) Letulle R. et Matthé G.: Presse méd. 1947, 630
- 128) Levis M., Ware: Blood 9, 520, 1954
- 129) Lewis J.H., Ferguson,
Davidson C., Minot G.
Taylor F. Blood 1, 166, 1946
- 130) Linke A.: DMW 77, 24, 1952, S. 775 - 780
- 131) Linke A., Lasch H.: Dtsch. Archiv f. klin. Med. Bd. 200
S. 385 - 392
- 132) Losse H.: Deutsch. med. Wschr. 77, 1323-1325, 1952
- 133) Lyttleton J.: Biochem. J., 58, 15, 1954
- 134) Mc Millan R.L.: Science 108, 416, 1948
- 135) Mann D., Barker N., Hurn: Blood 6, 838 - 844, 1951
- 136) Mann F.D., Hum M.M.: Am. J. Clin. Path. 20, 225, 1950
- 137) Marbet-Winterstein: Praxis 42, 4, 61 - 64, 1953
- 138) Marbet-Winterstein: Helv. Physiol. et Pharm. Acts 10, 528, 1952
- 139) Marazza P., di Girolamo: Clin. Ricambio, 15, 206 - 212, 1951
- 140) Marx R., Bayerle H.: Ärztl. Forschg. 2, 249, 1948
- 141) Marx R., Bayerle H.: Ztschr. Physiol. Chem. 283, 243, 1949
- 142) Marx R.: Verh. Ges. Inn. Med. 58, 582, 1952
- 143) Mateer, Baltz, Steele,
Brower und Colvert Amer. J. Med. Assoc. 133, 909, 1947
- 144) Mellanby J.: Proc. Roy. Soc. London B., 116, 1, 1934
- 145) Merz W.R.: Schweiz. Med. Wschr. 83, 110-111, 1953
- 146) Merz W.R., Christ M.A.: Schweiz. Med. Wschr. 82, 196-197, 1952
- 147) Milstone H.: J. Immunol 42, 109, 1941

- 148) Milstone J.: J. gen. Physiol. 31, 301, 1948
- 149) Mc Lean J.: Amer. J. Physiol. 41, 250, 1916
- 150) Montigel C.: Therap. Umschau 9, 27, 1952
- 151) Morawitz P.: Beiträge chem. Physiol. u. Path. 5, 133, 1904
- 152) Morawitz P.: Ergeb. Physiol. 4, 307, 1905
- 153) Moraux J.: C. r. Acad. Sci. 233, 711-713, 1951
- 154) Murray: Zit. nach Jorpes E.: Schweiz. med. Wschr. 77, 1947, 51
- 155) Naegeli Th., Matis P.: Die Medizinische 15, S. 511, 1953
- 156) Neuweiler W., Hess A.: Dtsch. med. Wschr. 85, 196, 1950
- 157) de Nicola P.: Klin. Wschr. 30, 512, 1952
- 158) Nolf P.: Schweiz. med. Wschr. 75, 110, 1945
- 159) Nolf P.: Arch. Physiol. (Liège) 6, 115, 1908
- 160) Nolf P.: Medicine 17, 381, 1938
- 161) Owen C.A., Bollmann J.L.: Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med. 67, 231, 1948
- 162) Owren P.A.: Proc. Norwegian Acad. Sci. 17, 21, 1944
- 163) Owren P.A.: Lancet 1, 446, 1947
- 164) Owren P.A.: Act. med. scand. Suppl. 194, 1947 ("the coagul. of blood invest. on a new clotting factor").
- 165) Owren P.A.: Amer. J. Med. 14, 201 - 215, 1953
- 166) Owren P.A.: Scand. J. Clin. a. Lab. Invest. 1, 162, 1949
- 167) Owren P.A.: Proc. 3rd. Int. Cong. Soc. Hematol., Cambridge 379, 1950
- 168) Owren P.A.: Internat. Tag. üb. Thrombose u. Embolie. Basel 1954
- 169) Pantlitschko M., Schmid J. Seelich, Kaiser: Hoppe, Seyler 289, 44, 1952

- 170) Pedrazzini A., Salvidio E.
Koller F.: Schweiz.med.Wschr. 79, 428, 1949
- 171) Plancherel P.: Z.f.klin.Med. 150, 213, 1952/53
- 172) Plum P., Dam H.: Klin.Wschr. 32, 1940
- 173) Plum P.: DMW 66, 1389, 1940
- 174) Quest M.M., Ware A.G.: Sci. 112, 21, 1950
- 175) Quick A.J.: Am.J.Physiol. 118, 260, 1937
Am.J.Physiol. 114, 282, 1935
- 176) Quick A.J.: Am.J.Physiol. 140, 212, 1943
- 177) Quick A.J.: Proc.Soc.exp.Biol.a.Med. 62, 249, 1946
- 178) Quick A.J.: L.Labor a.clin.Med. 31, 79, 1946
- 179) Quick A.J.: Lancet, 2, 379, 1947
- 180) Quick A.J., Hussey C.V.
Kaser M.: Amer.Heart J., 44, 119-123, 1952
Ref.Kong.Zbl.inn.Med.143,149,1953
- 181) Quick A.J., Stefanini M.: L.Lab.clin.Med. 34, 1203, 1949
- 182) Quick A.J.: Am.J.Sci., 214, 272, 1947
- 183) Quick A.J.: Amer.J.Physiol. 123, 712, 1938
- 184) Ratnoff Ref.in.Marbet,
Strässle, Winterstein: Die Medizinische 1, 21, 1955
- 185) Rein H.: Einführung i.d.Physiologie, Springer-
Verlag 1948
- 186) Rieben W.K.: Beiträge zur Kenntnis der Blutgerinnung
Basel 1947, Benno Schwabe & Co.
- 187) Rieben W.K.: Helvet.med.Act. 13, 295, W 662, 1946
- 188) Roderick L. M.: Amer.J.Physiol. 96, 413, 1931
- 189) Rosenthal R., Deskin O.
Rosenthal N.: Proc.Soc.exp.Biol.Med. 82, 171, 1953
- 190) Sandmann: Med.Wschr. 361, 1950

- 191) Salvini L., Capelli P.: *Biologica Latina* 4, 448, 1951
- 192) Schmid J., Weissel W.: *WienZ.inn.Med.* 28, 1, 1947, vereinfachte Methode z. Bestimmung d. Prothrombinzeit
- 193) Schmid A.: *Pflügers Arch.* Bd. VI, 1872, S. 413-538
- 194) Schmid A.: *Pflügers Arch.* Bd. IX, 1874, S. 353-357
- 195) Schmid A.: *Pflügers Arch.* Bd. XI, 1875, S. 1-52, 291-369, 515-577
- 196) Schmid A.: *Pflügers Arch.* Bd. XIII, 1876, S. 93-146, 146-176
- 197) Schmid A.: *Zur Blutlehre*, Leipzig 1892
- 198) Schmid A.: *Weitere Beiträge z. Blutlehre*, München Bergmann 1895
- 199) Schmid A.: *C. Mattiessen Dorpat* 1876
- 200) Schoffield F.W.: *J.amer.vet.med.Assoc.* 64, 553, 1924
- 201) Schulmann J., Smith C.: *Blood* 7, 794, 1952
- 202) Schultze E.: *Dissertation Greifswald*. 1891
- 203) Schultze H.E.: *Arch.exper.Path.u.Pharmak.* 207, 173, 1949
- 204) Schultze H.E.: *Die Medizinische* 42, 1354, 1953
- 205) Schultze H.E.: *Die Medizinische* 43, 1386, 1953
- 206) Schultze H.E.: *Hoppe Seyler's Z.physiol.Chem.* 289, 26, 1952
- 207) Schwan W.: *Ther.Ggdnw.* 91, 370, 1952
- 208) Schwarz E., Wanner, Koller: *Acta Haematol.* 6, 70, 1951
- 209) Scott R.: *Lancet* 262, 488, 1952
- 210) Secco C., Villani G.: *Neue med. Welt* 486, 1950
- 211) Seegers W.H.: *Circulation* 1, 2, 1950

- 212) Seegers W.H., McClaughry,
Fahey J.: Bool 5, 421, 1950
- 213) Seegers W., Johnson, Fell: Amer.J.Physiol. 176, 97, 1954
- 214) Shapio Sh.: J.Lab. Clin. Med. 26, 723, 1941
- 215) Shinowara G.J.: J.Lab.Clin. Med. 38, 11, 1951
- 216, Shinowara G.J.: Amer.J.Physiol. 156, 458, 1949
- 217) Sigg B.: Schweiz.med.Wschr. 82, 284, 1952
- 218) Snellmann Ol, Jensen R.
Sylvén B.: Biochem.biophys.acta 7, 98, 1951
- 219) Sorbye, Kruse, Dam: Acta Chem. Scand. 4, 549, 1950
- 220) Soulier J.P.: Le Sang 7, 448, 1946
- 221) Soulier J.P., Larrieu MG.: Le Sang 24, 205, 1953
- 222) Soulier J.P.: Sem.Hop. 27, 3867, 1951
- 223) Soulier J.P.: Bull. Mém. Soc. Méd. Paris 155, 201, 1951
- 224) Soulier J.P., Larrieu M.: Le Sang 23, 549, 1952
- 225) Soulier J.P., Larrieu M.: Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica
1-23, 1958
- 226) Stefanini M.: Blood, 4, 84, 1951
- 227) Stefanini M.: Am.J. Med. k4, 64, 1953
- 228) Steinmann B.: Praxis 41, 213, 1952
- 229) Tulloch J.A.: AmHeart J., 42, 864, 1951
- 230) Vries A. de, Alexander,
Goldstein: Blood 4, 247, 1949
- 231) Warner E., Brinkhouse,
Smith: Amer.J.Physiol. 114, 667, 1939
- 232) Ware A.G., Seegers W.: J. biol. chem. 174, 565, 1948
- 233) Ware, Guest, Seegers: J. biol. chem. 169, 231, 1947

- 234) Ware, Guest, Seegers: Science 106, 41, 1947
- 235) Ware A., Seegers W.: J.biol.chem. 172, 699, 1948
- 236) Ware A., Seegers W.: Am.J.physiol. 152, 567, 1948
- 237) Wöhlisch E.: Erg.Physiol. 28, 443, 1929
- 238) Wöhlisch E.: Verh.Ges.inn.Med. 58, 481, 1952
- 239) Wöhlisch E., Grüning W.: Biochem.Z., 305, 183, 1940.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, Herrn Oberarzt
Doz. Dr. MARX für die freundliche und vielfältige
Unterstützung meinen verbindlichsten Dank zu sagen.

Herrn Prof. Dr. STÖTTER danke ich ergebenst für
die Erlaubnis zur Benützung des haematologischen La-
bors und für die erhaltenen Anregungen.

LEBENS LAUF

Am 1.12.1925 wurde ich in Hilpoltstein /Mfr. als Sohn des Regierungsinspektors Hans Forster und seiner Ehefrau Walburga, geborene Reichler, geboren.

Nach 4-jährigem Besuch der Volksschule in Hilpoltstein besuchte ich von 1936-39 das human. Gymnasium in Neuburg /Donau. Infolge Versetzung meines Vaters nach Donauwörth besuchte ich von 1939-42 das dortige Gymnasium und anschliessend, von 1942-43 das Gymnasium in Nördlingen. Nach Abschluss der 7. Klasse erhielt ich den Reifevermerk.

Am 26.8.1943 wurde ich zum Heeresdienst einberufen. In Italien geriet ich am 18.4.1945 in amerikanische Kriegsgefangenschaft. Am 10.9.1945 wurde ich als Kriegsgefangener nach Frankreich verbracht und kehrte von dort am 28.11.1947 zurück.

Das Medizinstudium begann ich 1949 in Erlangen, wo ich 1950 das Vorphysikum und 1951 das Physikum ablegte.

Die klinischen Semester begann ich in Erlangen und setzte sie von 1952-53 in Göttingen und ab 1953 in Freiburg /Brsg. fort. Infolge familiärer Umstände und schwerer Erkrankung meines Vaters war ich 2 Jahre vom Studium beurlaubt.

Das Staatsexamen legte ich 1958 in Freiburg /Brsg. mit der Gesamtnote "gut" ab.

